

Aus dem Institut für Immunologie  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

## **Funktionsanalyse des Gens *Pftek1* in dendritischen Zellen.**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von  
**Leonie Grosse**  
aus  
Mutlangen  
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Brocker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Edgar Meinel  
Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Markus Zwick

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen

Prüfung: 21.04.2020

## Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname: Grosse, Leonie Philine Teresa Muriel

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
**Funktionsanalyse des Gens *Pfkl* in dendritischen Zellen**  
selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient  
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,  
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle  
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher  
oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen  
Grades eingereicht wurde.

München, 21.04.2020  
Ort, Datum,

Leonie Grosse  
Unterschrift Doktorandin

Eidesstattliche Versicherung Stand: August 2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Pathogenabwehr</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Das Immunsystem</b>	<b>3</b>
2.2.1	Das angeborene Immunsystem	3
2.2.2	Das adaptive Immunsystem	4
<b>2.3</b>	<b>Dendritische Zellen und das Immunsystem</b>	<b>5</b>
2.3.1	Subpopulationen und Entwicklung	5
2.3.2	Die dendritische Zelle während der Ausreifung und ihre Rolle bei der Entwicklung von Immunität und Toleranz	7
<b>2.4</b>	<b>Dendritische Zellen <i>in vitro</i></b>	<b>10</b>
<b>2.5</b>	<b>Das Gen <i>Pfkl</i></b>	<b>11</b>
2.5.1	Das Gen <i>Pfkl</i> in dendritischen Zellen	11
2.5.2	Das Genprodukt von <i>Pfkl</i>	11
2.5.3	Vorkommen und Funktion von <i>Pfkl</i> in verschiedenen Geweben	11
<b>2.6</b>	<b>Funktionsanalyse von Genen</b>	<b>12</b>
2.6.1	Gentransfer durch retrovirale Vektoren zur Überexpression von Genen	13
2.6.2	Gen-Knockout	16
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
3.1.1	Antikörper	17
3.1.2	Chemikalien	17
3.1.3	Geräte	18
3.1.4	Lösungen und Medien	18
3.1.5	Mausstämme	21
3.1.6	Lentivirale Vektoren	21
3.1.7	Verbrauchsmaterialien	22
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.2	Zell- und immunbiologische Methoden	27
3.2.3	Statistik	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Entwicklung einer Methode zur Überexpression von <i>Pfkl</i></b>	<b>35</b>
4.2.1	Herstellung lentiviraler Vektoren und Transduktion dendritischer Zellen	35
4.2.2	Testung verschiedener Transduktionsprotokolle	37

---

<b>4.3 Funktionsanalyse von <i>Pfkl</i> - Auswirkungen der lentiviral vermittelten Überexpression von <i>Pfkl</i> auf dendritische Zellen</b>	<b>40</b>
4.3.1 Auswirkungen der lentiviralen Transduktion/ <i>Pfkl</i> -Überexpression auf die Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs bzw. Homöostase der BMDCs	40
4.3.2 Auswirkungen der Überexpression von <i>Pfkl</i> auf die Ausreifung von CD11c <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> BMDCs	41
4.3.3 Auswirkungen der Überexpression von <i>Pfkl</i> auf die Zytokinproduktion von CD11c <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> BMDCs	44
<b>4.4 Analyse der Auswirkungen eines Gen-Knockout von <i>Pfkl</i> auf die Differenzierung und Ausreifung von BMDCs</b>	<b>46</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Überexpression durch lentivirale Transduktion</b>	<b>48</b>
5.1.1 Analyse verschiedener Transduktionsprotokolle	48
5.1.2 Kultur dendritischer Zellen <i>in vitro</i>	50
5.1.3 Auswirkungen der Überexpression von <i>Pfkl</i> auf die Ausreifung und Zytokinproduktion von BMDCs	50
5.1.4 Immunogene Einflüsse lentiviraler Transduktion auf BMDCs	51
<b>5.2 Funktionsanalyse des Gens <i>Pfkl</i> – <i>Pfkl</i>-KO Modell</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Fazit und Ausblick</b>	<b>54</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>61</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene cDC-Subtypen. Die Abbildung ist aus der Publikation T. Belz <i>et al.</i> entnommen und adaptiert [24].	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektorkonstrukte. 1. CMV_Pfkl_IRES_ZsGreen. 2. CMV_hCD2_IRES_ZsGreen.	16
Abbildung 3: "Knockout-First"-Konstrukt. Adaptiert von UCDavis KOMP Repository [71].	16
Abbildung 4: Bildliche Darstellung des Vektorrückgrats (pHAGE-CMV-hCD2-IRES-ZsGreen-W, Addgene Plasmid # 26532, von David Baltimore, [72]) .	22
Abbildung 5: Herstellung lentiviraler Vektoren mittels Ca <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Transfektion und lentivirale Transduktion von BMDCs zur Überexpression des Gens <i>Pfkl</i> :	36
Abbildung 6: Vergleich der Transduktionsprotokolle 1-3 und Strategie zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen in der Durchflusszytometrie:	39
Abbildung 7: Einfluss der lentiviralen Transduktion mit dem <i>Pfkl</i> -Vektor auf die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs bzw. Homöostase der BMDCs:	41
Abbildung 8: Auswirkungen der Überexpression von <i>Pfkl</i> auf die Ausreifung dendritischer Zellen: ....	43
Abbildung 9: Zytokinproduktion durch BMDCs die <i>Pfkl</i> durch lentivirale Transduktion überexprimieren im Vergleich zu der hCD2-Kontrolle und Vergleich der produzierten Menge dieser zwei Gruppen nach Stimulation mit LPS oder Poly I:C:	46
Abbildung 10: Auswirkungen eines Gen-KO von <i>Pfkl</i> auf die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs und Auswirkungen auf die Ausreifung der BMDCs im Vergleich zu Zellen aus einer C57BL/6 Maus:	47

---

## **Abkürzungen:**

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BMDCs	aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cells)
cDCs	klassische dendritische Zellen (classical dendritic cells)
CD	Gruppe von Oberflächenantigenen (cluster of differentiation)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CMV	Cytomegalievirus
DCs	Dendritische Zellen (dendritic cells)
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DFZ	Durchflusszytometrie
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting/scanning</i>
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HIV-1	Humanes Immunodefizienzvirus 1 (human immunodeficiency virus 1)
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
LT-cDCs	klassische dendritische Zelle in lymphatischem Gewebe
LTR	lange terminal wiederholte DNA Sequenzen
MCP-1	Monocytic chemotactic protein 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOI	Vielzahl der Infektion (multiplicity of infection)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NLT-cDCs	klassische dendritische Zelle in nicht lymphatischem Gewebe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a Protein

---

pDCs	Plasmacytoide dendritische Zellen
Pfkl1	Gen, welches für die Cyclin abhängige Kinase 14 kodiert
PPT	Polypurin-Sequenz
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors)
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SIN	selbst-inaktivierend
TAR	(transactivation response Element)
TFBS	Bindestelle für Transkriptionsfaktoren (transcription factor binding site)
Th1	Typ-1 T-Helferzelle
Th2	Typ-2 T-Helferzelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (toll like receptor)
VSV-G	Glykoprotein aus dem Vesicular stomatitis Virus (vesicular stomatitis virus glycoprotein G)
WPRE	posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Walddarmeltiers (woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element)
WT	Wildtyp



## 1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) nehmen durch ihre Spezialisierung auf Antigenprozessierung und -präsentation eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort ein. Sie beeinflussen entscheidend die Induktion von Immunität und Toleranz. Eine wichtige Voraussetzung und Eigenschaft für diese Funktionen ist dabei die Fähigkeit der DC zu reifen [1, 2]. Dieser hochkomplexe Prozess ist aktueller Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

*Pfkl*, ein Gen über dessen Funktion in DCs bisher wenig bekannt ist, wurde in dieser Arbeit genauer analysiert und mögliche Einflüsse des Gens auf die phänotypische, sowie auf die funktionelle Ausreifung untersucht. Erst kürzlich konnte durch vergleichende Promotoranalysen gezeigt werden, dass dieses Gen in DCs exprimiert wird und eine ähnliche Promotororganisation hat wie das Oberflächenantigen CD11c, ein sehr häufig eingesetzter Marker zur Abgrenzung von DCs. Es wurde zusätzlich beobachtet, dass die Expression von *Pfkl* nach Lipopolysaccharid (LPS) - induzierter Ausreifung abnimmt [3]. Diese Daten lassen einen Einfluss von *Pfkl* auf die Ausreifung von DCs vermuten. Mithilfe eines Überexpressionsmodells, sowie eines Gen-Knockout sollte diese Hypothese untersucht werden.

Mittels lentiviraler Transduktion wurde *in vitro* eine Überexpression des Gens in murinen, aus Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen (BMDCs) hervorgerufen. Dies erforderte zu Beginn die Etablierung eines funktionierenden Transduktionsprotokolls. So wurde in dieser Arbeit nach Untersuchung von drei zeitlich verschiedenen Transduktionsabläufen ein Protokoll entwickelt, welches eine stabile Überexpression des Gens gewährleistete. Anschließend wurde die phänotypische Ausreifung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (DFZ) anhand der Oberflächenantigene MHCII und CD86 untersucht. Zusätzlich wurde die Zytokinproduktion als wichtiger Teilaspekt der funktionellen Ausreifung analysiert.

*In vitro* zeigte sich kein Effekt des überexprimierten Gens *Pfkl* auf die phänotypische Ausreifung oder Zytokinproduktion.

Es konnte jedoch ein starker immunogener Effekt der lentiviralen Transduktion *per se* auf die phänotypische Ausreifung der BMDCs nachgewiesen werden. Nach lentiviraler Transduktion konnte, Transgen unabhängig, eine überproportionale Hochregulation kostimulatorischer Moleküle beobachtet werden. Dieser Effekt wirkte sich allerdings kaum auf die funktionelle Ausreifung aus. Auch nach lentiviraler Transduktion wurden

physiologische Zytokinkonzentrationen durch die BMDCs sezerniert. Diese Beobachtungen weisen auf einen differentiellen Effekt der lentiviralen Transduktion auf verschiedene Aspekte der Reifung hin.

Weiterführende Analysen zur Funktion des Gens unabhängig von lentiviraler Transduktion erfolgten anhand von BMDCs einer *Pfkl*-Knockout-Maus (*Pfkl* KO).

Eine Untersuchung der phänotypischen Ausreifung konnte keine Auswirkungen der *Pfkl*-Defizienz nachweisen.

Zusammenfassend sprechen die Untersuchungen in dieser Arbeit gegen einen Einfluss des Gens auf die Ausreifung von BMDCs.

Allerdings ist die verwendete Methode der lentiviralen Überexpression von *Pfkl* aufgrund der hier nachgewiesenen immunogenen Effekte nur eingeschränkt zur Analyse der phänotypischen Ausreifung nutzbar. Diese Auswirkung muss in der klinischen Anwendung auch für die Nutzung lentiviraler Vektoren in gentherapeutischen Verfahren beachtet werden [4] und erfordert eine tiefergehende Aufarbeitung dieser partiell immunogenen Effekte auf die Ausreifung.

Für weiterführende Funktionsanalysen des Gens würden sich eingehendere Untersuchungen der phänotypischen und funktionellen Ausreifung der BMDCs aus der *Pfkl*-KO Maus *in vitro* und *in vivo* anbieten, um möglichen Einflüssen des Gens unabhängig von lentiviraler Stimulation nachzugehen. Auch könnten die *Pfkl*-defizienten DCs dazu genutzt werden, über die Ausreifung hinaus Erkenntnisse zur Funktion dieses Gens zu gewinnen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Pathogenabwehr**

Verschiedene Mechanismen tragen in Säugetieren zur Abwehr und Bekämpfung von infektiösen Krankheitserregern bei. Eine erste wichtige Strategie ist die Vermeidung und Erkennung von Infektionsquellen bevor eine Infektion stattfindet, beispielsweise das Erkennen verdorbener Nahrung. Hier spielt das olfaktorische, gustatorische und visuelle System eine wichtige Rolle [5]. Zusätzlich sind anatomische und physiologische Barrieren sehr wichtig bei der Abwehr von Krankheitserregern [6]. Kommt es dennoch zu einer Infektion des Organismus ist die Abwehr durch das Immunsystem entscheidend. Dieses hochkomplexe System erkennt Pathogene und kann diese neutralisieren oder eliminieren [5]. Eine herkömmliche Einteilung dieses Systems erfolgt in angeborenes und adaptives Immunsystem [7].

Zusätzlich gibt es eine weitere Strategie des Organismus mit einer Infektion umzugehen. Dies ist die Fähigkeit Pathogene in einem gewissen Ausmaß zu tolerieren und dadurch auch die negativen Effekte einer Infektion und die negativen Effekte der Immunabwehr, die natürlicherweise bei der Bekämpfung von Pathogenen auftreten, zu minimieren [5].

### **2.2 Das Immunsystem**

#### **2.2.1 Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem existiert in allen mehrzelligen Lebewesen. In dieser Arbeit geht es vor allem um das Immunsystem von Säugetieren.

Zu den wichtigsten Eigenschaften des angeborenen Immunsystems gehört die schnelle Reaktionszeit. Dadurch kann es unmittelbar auf schädliche Eindringlinge reagieren. Mit einer beschränkten Anzahl an Rezeptoren, die in der Keimbahn festgelegt sind, kann das angeborene Immunsystem Komponenten verschiedener Pathogene erkennen. Trotz der limitierten Anzahl an Rezeptoren ist dieses System sehr effektiv und kann eine Vielzahl an Pathogenen erkennen und bekämpfen. Dies liegt unter anderem daran, dass es auf Komponenten spezialisiert ist, die essentiell für diese Pathogene sind und oft vielen Pathogenen gemein sind. Diese Rezeptoren werden auch Mustererkennungsrezeptoren (PRR, Pattern recognition receptors) genannt. Zu ihnen zählen beispielsweise die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) [6, 8].

Hämatopoetische Zellen mit verschiedenen Funktionen tragen zum angeborenen Immunsystem bei. Unter anderem Makrophagen, DCs, natürliche Killerzellen, Eosinophile und Neutrophile Zellen. Nicht hämatopoetische Zellen wie etwa die Schleimhaut im Magen und Darm oder das Epithel des Respirationstrakts von Säugetieren sind ebenfalls beteiligt. Zusätzlich hat das angeborene Immunsystem noch eine humorale Komponente. Eine Vielzahl an Proteinen wie beispielsweise das C-reaktive Protein oder das Komplementsystem sind Teil dieser schnellen Abwehr.

Weiterhin hat das angeborene Immunsystem großen Anteil an der Aktivierung des adaptiven Immunsystems und beide Systeme können sich gegenseitig verstärken [6].

### **2.2.2 Das adaptive Immunsystem**

Dem angeborenen Immunsystem zeitlich nachgeschaltet ist das adaptive Immunsystem. Es hat sich evolutionär nur in den Wirbeltieren entwickelt und zeichnet sich durch eine große Vielfalt von hochspezifischen antigenerkennenden Rezeptoren aus. Es dauert einige Tage nach Eindringen und Erkennen des Pathogens bis dieses System seine ganze Wirksamkeit entfaltet [6, 7]. Es kommt unter anderem zum Einsatz, wenn die Bestandteile des angeborenen Immunsystems das Eindringen von Pathogenen nicht oder nicht vollständig aufhalten können. Zusätzlich arbeiten beide Teile synergetisch und ergänzen sich. Das adaptive Immunsystem ist außerdem für die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses und der Toleranz gegenüber eigenen Körperbestandteilen zuständig. Die Gedächtnisfunktion bewirkt, dass bei einer Zweitinfektion mit einem dem Immunsystem bereits bekannten Erreger dieser schneller und effektiver bekämpft werden kann. Hauptkomponenten des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten. Diese Zellen erkennen sehr spezifisch Antigene. Die Rezeptoren dieser Zellen sind nicht in der Keimbahn festgelegt, sondern entstehen durch Genrekombination während der Lymphozytenentwicklung [9].

Eine wichtige Zellpopulation die zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem vermittelt, sind die DCs. Sie sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC). Auf die Funktion der DC wird im Folgenden genauer eingegangen [9].

## 2.3 DCs und das Immunsystem

DCs stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Verschiedene Funktionen und Merkmale machen diese Zellpopulation zu einem wichtigen Mediator bei der Induktion von Immunität aber auch bei der Induktion von Toleranz gegenüber körpereigenen Bestandteilen. Ihre Lokalisation in nicht-lymphatischem Gewebe mit konstantem Antigenkontakt spielt hierbei eine wichtige Rolle. Sie haben die Fähigkeit Gewebsverletzungen zu detektieren und Antigene zu prozessieren. Sie wandern dann zu den T-Zellregionen der lymphatischen Organe, wo sie den T-Zellen Antigene präsentieren [10, 11]. Dies kann zu einer Immunantwort oder zur Entwicklung von Toleranz führen [12, 13].

### 2.3.1 Subpopulationen und Entwicklung

DCs lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene, ihrer Funktion und der Fähigkeit zur Spezialisierung in zahlreiche Subpopulationen unterteilen. Eine erste Unterteilung erfolgt in klassische dendritische Zellen (cDCs) und plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs).

In Funktion und Oberflächenmarkern unterscheiden sich pDCs stark von den cDCs. Weniger effektiv in der Antigenpräsentation, reagieren pDCs vor allem auf Viren mit der Produktion großer Mengen Interferon Typ 1. Ein wichtiger Marker dieser Zellen ist B220. Zusätzlich exprimieren sie weniger MHCII oder CD11c [10, 14].

Im Folgenden wird es hauptsächlich um die **cDCs** gehen.

Konstitutiv exprimierte Oberflächenantigene der cDCs sind MHCII, membrangebundene Glykoproteine wie CD11c und CD45. Diese werden häufig genutzt um eine grobe Abgrenzung der cDCs zu erreichen [10]. Die cDCs sind spezialisiert auf die Prozessierung und Präsentation von Antigenen. Einige cDCs werden als migratorisch bezeichnet, wenn sie in die B- und T-Zell Regionen von lymphatischen Organen einwandern und die T-Zellen sowohl im Ruhezustand als auch bei Infektion regulieren [15].

cDCs können weiter unterteilt werden, nach in nicht lymphatischem Gewebe und in lymphatischem Gewebe ansässigen cDCs [10, 16].

### **2.3.1.1 Entwicklung - Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu DCs**

DCs sind heute als eigene Zelllinie akzeptiert, die sich aus DC-spezifischen Vorläuferzellen entwickeln bzw. differenzieren [17, 18]. Die Entwicklung beginnt mit hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Studien deuten darauf hin, dass diese hämatopoetischen Stammzellen mehrheitlich myeloiden Ursprungs sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich eine geringe Menge der DCs in der Milz, sowie ein größerer Anteil der DCs im Thymus aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickelt [19].

Über verschiedene Stufen entwickeln sich die hämatopoetischen Stammzellen in einen Vorläufer, aus dem sich sowohl Makrophagen als auch DCs entwickeln können. Aus diesem entwickelt sich dann der allgemeine DC-Vorläufer. Aus diesem können sich sowohl pDCs als auch Vorläufer der cDCs (pre-cDCs) entwickeln, jedoch keine Monozyten mehr. Aus den pre-cDCs können sich dann verschiedene Subtypen der cDCs entwickeln [15, 18].

### **2.3.1.2 Subpopulationen - cDCs in nicht lymphatischem Gewebe (NLT-cDCs)**

cDCs können bis zu 5% der Zellen in nicht lymphatischen Organen ausmachen. Zwei Hauptgruppen werden anhand der Marker CD11b und CD103 unterschieden. Die erste Subgruppe ist CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> [10]. Es gibt eine gleichartige Subpopulation cDCs in lymphatischem Gewebe, die CD8<sup>+</sup> cDCs, sie entwickeln sich aus denselben Vorläuferzellen und haben ein ähnliches Differenzierungsmuster [20]. Xcr1 ist ein gemeinsamer Marker der CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cDCs und der CD8<sup>+</sup> cDCs [21]. Die CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cDCs kann man in den meisten Bindegeweben finden und in den Peyer'schen Plaques im Darm.

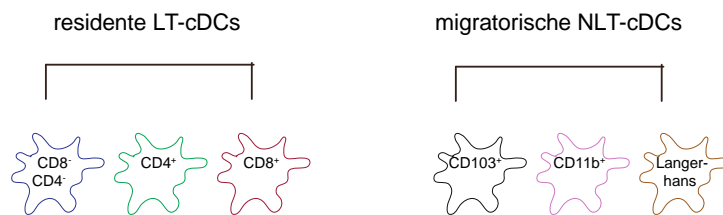
Die 2. Subgruppe wird als CD11b<sup>+</sup> cDCs klassifiziert. Diese Gruppe zeigt zusätzlich hohe Level der Marker CX3CR1, F4/80 und Sirp-alpha.

Die NLT-cDCs migrieren ständig über die Lymphe in die T-Zellregionen der Lymphknoten um dort Antigene zu präsentieren [10].

Eine weitere Gruppe von cDCs in nicht lymphatischem Gewebe sind die Langerhanszellen der Epidermis, die sich in bestimmten Eigenschaften von den cDCs in anderen Geweben unterscheiden. Sie zeichnen sich unter anderem durch die hohe Expression eines C Typ Lectins aus, dem Langerin, sowie niedrigen Leveln MHCII und CD11c [10, 22].

### 2.3.1.3 cDCs in lymphatischem Gewebe (LT-cDCs)

LT-cDCs zeichnen sich dadurch aus, dass sie in lymphatischem Gewebe verbleiben. Während sich in Lymphknoten NLT-cDCs und LT-cDCs befinden, findet man in der Milz nur DCs, die ihren gesamten Lebenszyklus in lymphatischem Gewebe verbringen. LT-cDCs können grob weiter unterteilt werden anhand der Expression der Oberflächenantigene CD4 und CD8<sup>+</sup> [10, 23, 24].



**Abbildung 1: Verschiedene cDC-Subtypen.** Die Abbildung ist aus der Publikation T. Belz *et al.* entnommen und adaptiert [24].

### 2.3.2 Die DC während der Ausreifung und ihre Rolle bei der Entwicklung von Immunität und Toleranz

Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Funktionen in Immunantwort und Toleranzinduktion, ist die Fähigkeit der cDCs eine Entwicklung von unreif zu reif durchzumachen. Diese Entwicklung ist mit Veränderungen in der Morphologie und dem Erwerb von Fähigkeiten wie Antigenpräsentation, Zytokinproduktion und -sekretion, sowie Migration, verbunden.

Der Phänotyp unreifer cDCs ist charakterisiert durch niedrige Level an MHCII und anderen ko-stimulatorischen Molekülen wie CD86, CD80 oder CD40 [16, 25]. Werden sie durch einen bestimmten Stimulus aktiviert, wie beispielsweise das Eindringen von Fremdkörpern durch eine Verletzung oder eine Infektion, steigt die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle und MHCII [26]. *In vitro* kann dies durch die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) erreicht werden [27, 28]. Dabei spielen TLRs eine wichtige Rolle. Diese gehören zur Familie der PRRs. Mit ihnen können die cDCs Strukturen von Pathogenen erkennen [16, 29]. Ein weiteres Merkmal der Reifung ist die Wanderung von cDCs zu den T-Zell Regionen der Lymphknoten [25, 30]. Während der Reifung verlieren die Zellen zunehmend die Fähigkeit Antigene aufzunehmen [16].

DCs spielen eine essentielle Rolle bei der Stimulation naiver T-Zellen. Dies geschieht nicht nur durch Antigenpräsentation, sondern auch durch die Sekretion von Zytokinen.

Dabei werden unterschiedliche Zytokine ausgeschüttet, abhängig vom Ausreifungsgrad der DCs. Unter anderem Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, und IL-18. Zusätzlich spielt es eine Rolle wodurch die DCs zur Ausreifung angeregt wurde. Studien konnten zeigen, dass nach LPS-Simulation andere Zytokine ausgeschüttet werden als nach Stimulation mit CD40 [31]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit LPS bestimmte Zytokine unterschiedlich schnell sekretiert werden. TNF-alpha und IL-6 wurden bereits 3-4 Stunden nach Stimulation sekretiert, während die Sekretion von IL-12 deutlich später begann. Dies könnte eine Rolle bei der Migration spielen, unterschiedliche Zytokine wirken während der Migration auf unterschiedliche Umgebungen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass bestimmte Zytokine die DCs in einer autokrinen Weise regulieren. Es gibt Anzeichen dafür, dass IL-10 die Sekretion von IL-12 negativ beeinflusst [32].

Eine Ausreifung der DCs läuft aber nicht nur auf einen Stimulus hin ab. Neuere Studien zeigen wie migratorische cDCs teilweise auch ohne spezifischen pathogenen Reiz ausreifen und in die Lymphknoten wandern, möglicherweise durch Entzündungsmediatoren die ständig in kleinen Mengen im Gewebe ausgeschüttet werden. Im Gegensatz dazu bleiben cDCs in lymphatischen Organen ohne den Stimulus eines Pathogens in einem unreifen Zustand [33].

### **2.3.2.1 Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung**

Die Antigenpräsentation ist eine wichtige Funktion der DCs und von entscheidender Bedeutung für das adaptive Immunsystem, sowohl bei der Initiierung einer Immunantwort als auch bei der Induktion von Toleranz. Dabei beeinflussen DCs auch die Art der Immunantwort die nach Erkennen einer pathogenen Struktur initiiert wird, abhängig von den verschiedenen Subpopulationen oder dem Reifungsgrad der DCs.

Antigene werden auf verschiedenen Wegen prozessiert, T-Zellen präsentiert und diese dadurch aktiviert [34]. Wichtig für die Antigenpräsentation sind die MHC Proteine. MHCI wird in fast allen Zellpopulationen des Organismus exprimiert und die auf MHCI präsentierten Antigene von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. MHCII wird von allen APC exprimiert und spielt bei der Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle [35]. Im Kontext der Antigenpräsentation wird häufig von exogenen und endogenen Antigenen gesprochen. Endogene Antigene sind von der Zelle selbst synthetisiert, während exogene Antigene von der Zelle aufgenommene Antigene sind. Endogene Antigene können dabei auch virale Proteine sein, die nach Infektion der Zelle von der Zelle



synthetisiert werden. DCs haben die Fähigkeit sowohl endogene als auch exogene Antigene zu präsentieren. Endogene Antigene werden dabei hauptsächlich auf MHC I präsentiert. Eine wichtige Ausnahme hierzu ist die Kreuzpräsentation. Es hat sich gezeigt, dass insbesondere  $CD8^+$  DCs zu einer sehr effektiven Kreuzpräsentation fähig sind. Das bedeutet sie können exogene Antigene auf MHC I präsentieren. Diese Funktion ist sehr wichtig, wenn körpereigene Zellen infiziert sind, beispielsweise durch einen Virus, aber nicht die cDCs selbst. Die zytotoxischen T-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Eliminierung dieser infizierten Zellen spielen, benötigen professionelle Antigen-präsentierende Zellen um aktiviert zu werden.

Auf MHC II werden vor allem exogene Proteine präsentiert, die in endosomalen Kompartimenten der Zelle, wie den Lysosomen hydrolysiert worden sind. Es gelangen jedoch auch endogene Proteine in die endosomalen Kompartimente der Zelle und werden anschließend über MHC II präsentiert [33, 36, 37].

Verschiedene Untergruppen der cDCs unterscheiden sich auch dadurch, welche Antigene sie besonders gut aufnehmen können.  $CD8^+$  DCs in lymphatischem Gewebe sind beispielsweise besonders fähig tote Zellbestandteile aufzunehmen. Wohingegen vieles darauf hindeutet, dass  $CD11b^+ CD8^-$  DCs besser exogene Antigene über MHC II präsentieren können [10, 33].

### **2.3.2.2 Toleranz**

Toleranz bedeutet, dass Immunzellen nicht auf ein bestimmtes Antigen reagieren. Diese Funktion ist sehr wichtig für den Organismus, da sie Autoaggression, also eine Immunreaktion auf körpereigene Bestandteile verhindert. Die Induktion von Toleranz erscheint zunächst gegensätzlich zur Funktion der DC in der Immunantwort. Studien deuteten darauf hin, dass eine Kombination dieser beiden Funktionen dadurch erreicht wird, dass unreife DCs eher Toleranz induzieren, während cDCs auf einen externen Stimulus, wie eine Infektion, durch Ausreifung und Stimulation von T-Zellen reagieren [12]. Mittlerweile zeigen andere Studien jedoch, dass möglicherweise nicht nur der Reifungsgrad ausschlaggebend ist. Es scheint eine teilweise Ausreifung der DCs auch bei der Toleranzinduktion wichtig zu sein. Eine Interaktion zwischen  $CD4^+$  T-Helferzellen und DCs scheint eine Rolle zu spielen, ob DCs Toleranz induzieren oder die Aktivierung  $CD8^+$  T-Zellen auslösen [38].

So tragen DCs durch Interaktion mit T-Zellen zur zentralen und peripheren Toleranzinduktion bei. Die Fähigkeit der T-Lymphozyten eine Vielzahl an Antigenrezeptoren zu generieren, birgt ebenfalls die Gefahr der Autoreaktivität. Im

Thymus findet eine erste Kontrolle der T-Lymphozyten statt. Autoreaktive T-Zellen können dabei entweder durch negative Selektion eliminiert werden oder sie entwickeln sich zu regulatorischen T-Zellen. In beiden Prozessen spielen DCs eine wichtige Rolle [39-41]. Regulatorische T-Zellen sind wichtig für die Eigentoleranz, indem sie beispielsweise eine Proliferation von Effektor-T-Zellen verhindern [42]. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von DCs im Thymus zu einem vermehrten Auftreten von autoreaktiven T-Zellen führt [13].

DCs sind aber nicht nur wichtig für diese zentrale Toleranz, sondern auch für die periphere Toleranz [39]. Autoreaktive T-Zellen, die bei der zentralen Selektion nicht erkannt wurden, werden in der Peripherie mit Hilfe der DCs eliminiert. Es wurde beschrieben, dass die DCs in der Peripherie möglicherweise durch die Prozessierung körpereigener Antigene diese als eigen definieren und so Toleranz induzieren [39, 43].

## 2.4 DCs *in vitro*

Häufig genutzte Methoden zur Untersuchung von DCs *in vitro* sind die Kultivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus der Milz oder dem Knochenmark von Mäusen. Um eine Differenzierung dieser Zellen zu DCs zu bewirken wird oft der "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) benutzt. Dieses Zytokin ist ein wichtiger Wachstumsfaktor. Die daraus resultierenden DCs exprimieren MHCII und CD11c auf ihrer Oberfläche [44, 45]. *In vivo* spielt dieses Zytokin vor allem bei der Entwicklung inflammatorischer DCs eine Rolle. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass diese Zellpopulation den in lymphatischem Gewebe ansässigen DC-Subpopulationen *in vivo* wenig ähnlich ist. Zu Generierung einer Zellpopulation die den ortsansässigen DCs ähnlicher ist wird häufig FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L) *in vitro* verwendet. Das Zytokin FLT3L spielt *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von cDCs und pDCs im Gleichgewichtszustand [33, 46].

## 2.5 Das Gen *Pfkl*

### 2.5.1 Das Gen *Pfkl* in DCs

In einer Studie von Edelmann *et al.* 2011 [3] wurden murine Transkriptionsnetzwerke untersucht. Ein Vergleich zwischen spezifischen Promotorregionen von DCs ergab ein evolutionär konserviertes Promotornetzwerk. Bestehend aus 4 Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (*transcription factor binding sites*). Dieses Modell wurde dazu genutzt, um in bioinformatikbasierten Datenbanken nach Genen zu suchen, die unter der Kontrolle des gleichen Promotornetzwerks stehen. Dies führte zu der Entdeckung, dass das Gen *Pfkl* eine ähnliche Promotororganisation wie das cDC-typische Oberflächenantigen CD11c hat und in DCs exprimiert wird [3].

### 2.5.2 Das Genprodukt von *Pfkl*

*Pfkl* ist ein Gen, welches für die Serin/Threonin Proteinkinase PFTAIRE 1 kodiert. Dieses Enzym wurde als zugehörig zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) beschrieben [47]. Ein weiterer Name für das Genprodukt ist Cyclin-abhängige Kinase 14 (CDK-14) [48].

In der Regulation des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen spielen CDKs eine wichtige Rolle bei der Progression in die nächste Phase des Zellzyklus. Die CDKs sind Serin/Threonin Kinasen und haben alle ein evolutionär konserviertes Motiv gemein, welches an der Bindung von Cyclinen beteiligt ist [47, 49]. Die Familie der Cycline wird durch die Cyclinbox charakterisiert, eine 100 Aminosäurereste lange homologe Sequenz, die mit den CDKs interagiert. Durch diese Interaktion entsteht ein aktiver Proteinkinasekomplex [50].

### 2.5.3 Vorkommen und Funktion von *Pfkl* in verschiedenen Geweben

Hohe Expressionslevel von *Pfkl* wurden im Menschen in Gehirn, Herz, Pankreas, den Nieren, sowie den Ovarien und Hoden vorgefunden. Geringere Level in Thymus und Milz [47] [51]. In einer Arbeit von Edelmann *et al.* 2011 [3] konnte durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)-basierte mRNA-Analysen auch in murinen DCs die Expression von *Pfkl* nachgewiesen werden.

Über die physiologische Funktion von *Pfkl* bzw. dem Genprodukt PFTAIRE 1 ist seit seiner Entdeckung in Mäuseneuronen noch wenig herausgefunden worden [52].

*Pftk1* scheint möglicherweise an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein. Analysen ergaben eine Interaktion von PFTAIRE 1 mit dem Cyclin CCND3. Die Kinaseaktivität von PFTAIRE 1 ist von diesem Cyclin abhängig. Zusätzlich interagiert die Proteinkinase mit dem universellen CDK Inhibitor p21 Cip1 und wird von diesem inhibiert. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass der Komplex aus CCND3 und PFTAIRE 1 das Tumorsuppressorgen RB phosphoryliert und p21 Cip1 dies inhibiert. Dies passt zu den Hinweisen, dass PFTAIRE 1 möglicherweise eine Rolle beim Übergang von G1 zu S im Zellzyklus spielen könnte. Nach Ausschalten des Gens konnte ein Zellzyklusarrest in der G1 Phase beobachtet werden und nach einer Überexpression des Gens wurde Zellproliferation beobachtet [47].

Zusätzlich interagiert PFTAIRE 1 mit dem Cyclin Y, dieses verstärkt die Kinaseaktivität und ist wichtig bei der Rekrutierung von PFTAIRE 1 zur Plasmamembran [53].

Eine weitere Rolle scheint *Pftk1* in verschiedenen Tumorgeweben und bei der Tumordinvasion zu haben [54].

Beispielsweise ist der Komplex aus PFTAIRE 1 und CCNY mit dem nicht kanonischen Wnt Signalweg assoziiert. Dieser Signalweg ist an der Embryogenese und verschiedenen Krankheitsprozessen beteiligt, unter anderem auch an der Krebsentstehung. Dieser Zusammenhang scheint eine Rolle bei der Metastasierung des hepatozellulären Karzinoms zu spielen [55].

## 2.6 Funktionsanalyse von Genen

Um mehr über die Funktion von Genen zu erfahren hat sich neben dem Gen-Knockout die Überexpression von Genen als wichtige Methode etabliert. Dabei können teilweise Signalwege oder Faktoren detektiert werden, die bei der klassischen Methode des Gen-Knockout unentdeckt bleiben. Welche Auswirkungen eine Überexpression von Genen haben kann, wird beispielsweise bei der Tumorentstehung deutlich. In einigen Tumoren spielt die Überexpression bestimmter Gene eine entscheidende Rolle für das Tumorstadium oder die Entstehung. Die Überexpression eines Gens kann dabei eine Aktivierung eines Proteins/Enzyms auslösen oder eine Inhibition eines Proteins oder Signalwegs bewirken. Eine Inhibition kann beispielsweise durch Behinderung der Translation bewirkt werden. Eine Aktivierung, beispielsweise durch vermehrte Degradierung eines Inhibitors des Signalwegs [56].

Eine Möglichkeit eine Überexpression von Genen künstlich zu erreichen ist die Nutzung viraler Vektoren. Im Folgenden wird die in dieser Arbeit verwendete Methode des lentiviralen Gentransfers zur Überexpression des Gens *Pfkl* in BMDCs näher beschrieben. Die Methode des Gen-Knockouts wurde zur Funktionsanalyse von *Pfkl* in dieser Arbeit ebenfalls verwendet und wird in 2.6.2 beschrieben.

### **2.6.1 Gentransfer durch retrovirale Vektoren zur Überexpression von Genen**

Für einen Gentransfer in BMDCs wurden in dieser Arbeit lentivirale Vektoren verwendet. Lentiviren sind eine Untergruppe in der Familie der Retroviren. Lentivirale Vektoren sind besonders gut geeignet um Gene in hämatopoetischen Stammzellen zu exprimieren, weshalb sie in dieser Arbeit Verwendung finden. Dies liegt an ihrer Fähigkeit auch nicht teilungsaktive und sich langsam teilende Zellen zu infizieren [57-59]. Im Folgenden wird auf den Replikationszyklus von Lentiviren anhand von HIV-1 und anschließend auf die Herstellung der lentiviralen Vektoren eingegangen.

#### **2.6.1.1 Replikationszyklus und Struktur von HIV-1**

Zentraler Bestandteil des HI-Virus sind Nukleinsäuren und das Kapsid. Diese sind von einer Lipidmembran umgeben. Nach Eintritt in die Wirtszelle wird die virale Lipidmembran entfernt und die genomische RNA des Virus wird im Zytoplasma der Zelle durch die reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Komplex mit viralen Proteinen wird diese DNA dann in den Zellkern überführt. Die virale Integrase integriert diese DNA dann in das Wirtsgenom. Dabei schneidet sie sowohl die virale DNA als auch die chromosomale Wirts-DNA und ligiert diese.

Das virale Genom von HIV-1 besteht aus zwei Kopien einzelsträngiger RNA. Neun Gene kodieren für 15 verschiedene Proteine [59, 60]. Die Polyproteine Gag, Pol und Env sind allen Retroviren gemein. Proteine der *Gag* und *Env* Gene stellen das Viruskapsid und die Virushülle, während das *Pol* Gen für virale Enzyme, wie Integrase, Reverse Transkriptase und Protease, kodiert. Zusätzlich beinhaltet das virale Genom akzessorische Proteine (Tat, Rev), die vor allem regulatorische Funktion haben oder am Zusammenfügen des Virus beteiligt sind (Vpu). Vif, Vpr und Nef sind Teil des Viruspartikel [59, 60]. Außerdem haben diese akzessorischen Gene virulenzfaktorartige Funktionen [61]. Die akzessorischen Gene sind *in vitro* nicht relevant für die Virusreplikation [62]. Die Proteinkodierenden Bereiche werden von verschiedenen Elementen flankiert. Dazu gehören die am 3' und am 5' Ende befindlichen langen

terminal wiederholten Sequenzen (LTR). Bestehend aus der U3-Region am 3' Ende und der U5-Region am 5' Ende, sowie den sich wiederholenden Elementen R. Die LTR haben wichtige Funktionen bei der Integration des Virus in das Wirtsgenom, sowie Enhancer und Promoterfunktion und wirken dabei als Cis-Elemente. Cis-Elemente befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den kodierenden Bereichen und werden für die Transkription benötigt. Sie interagieren mit Transkriptionsfaktoren. Außerdem enthalten die LTR Polyadenylierungssignale und das *transactivation response Element* (TAR), eine Bindestelle für das regulatorische Protein Tat. Der kodierende Bereich ist noch von weiteren Cis-wirkenden Elementen umgeben, dies sind die Primer Bindestelle (PBS), die Polypurin-Sequenz (PPT) und das RNA Verpackungssignal [58, 60].

Die Vermehrung des Virus läuft *in vivo* in verschiedenen Schritten ab. Das virale Genom wird in die Wirts-DNA integriert und anschließend mithilfe der Enzymmaschinerie des Wirts abgelesen. Das Ablesen des viralen Genoms wird durch das Protein Tat verstärkt, welches auch die Expression von MHCII in den infizierten Zellen abschwächt um eine Immunantwort gegen die befallende Zelle zu unterdrücken. Nach der Transkription wird die mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma überführt. Dort findet die Translation der Virusproteine und deren Verpackung statt. Die Env mRNA wird im endoplasmatischen Retikulum translatiert. Schließlich findet das Zusammenfügen des Virus statt. Daran sind Gag und Gag-Pol Polyproteine beteiligt, sowie drei akzessorische Proteine Vif, Vpr und Nef und die genomische RNA. Nach der Abkapslung des neuen Virus, finden noch einige Reifungsprozesse statt. HIV infiziert hauptsächlich T-Zellen und Makrophagen. Diese Zellen exprimieren den CD4-Rezeptor. Gp120 (eines der viralen Env Proteine) bindet an CD4. Das zweite Env Protein Gp41 hilft bei der Fusion des Virus mit der Zellmembran, durch Konformationsänderungen und Interaktion mit Chemokinrezeptoren, die als Korezeptoren funktionieren [59, 60, 63].

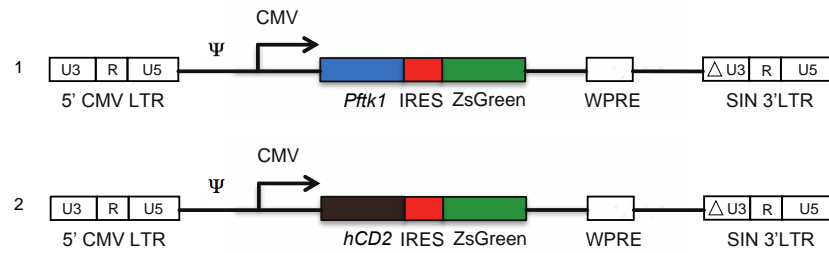
#### **2.6.1.2 Lentivirale Vektoren**

In dieser Arbeit sollten Gene in sich langsam teilende hämatopoetische Stammzellen, DC-Vorläuferzellen und BMDCs transferiert werden. Dafür wurden lentivirale Vektoren genutzt (siehe 3.1.6).

Für die Herstellung der lentiviralen Vektoren wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 FT) mit verschiedenen Plasmiden ko-infiziert, siehe auch 3.1.6. Eines der Plasmide ist der Transfervektor, er beinhaltet das Transgen von Interesse. Zusätzlich beinhaltet dieses Plasmid Cis- wirkende Elemente wie die LTRs, die PPT, sowie das

Verpackungssignal  $\Psi$ . Die Expression des Transgens wird durch einen internen Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor) kontrolliert. Zusammen mit Plasmiden die für Verpackungs- und Hüllproteine kodieren und die keine Cis-wirkenden Elemente enthalten werden dann die humanen embryonalen Nierenzellen ko-infiziert. Um sichere, replikationsdefiziente Vektoren zu produzieren ist es wichtig, Cis Elemente, die nicht unbedingt auf demselben Nukleinsäurestrang vorliegen müssen, zu trennen und wichtige regulatorische und enzymatische Proteine des Virus auf verschiedenen Plasmiden zu platzieren. Deswegen werden alle kodierenden Bereiche auf dem Transfervektor entfernt, bis auf die oben genannten Cis-Elemente. Das Verpackungsplasmid enthält nur die Gene für Gag, Pol und Rev, da die vier akzessorischen Gene Vpr, Vif, Nef und Vpu *in vitro* nicht benötigt werden zur Herstellung lentiviraler Vektoren [59, 64]. Das Env Protein im Hüllplasmid wurde durch das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis Virus VSV-G ersetzt. Dies ermöglicht eine Bindung und Infektion verschiedener Zellen. Zur Verstärkung der Genexpression kam hier noch das WPRE Element (*Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*) zum Einsatz. Die hier verwendeten lentiviralen Vektoren der 3. Generation haben eine weitere Sicherheitskomponente, um die Entstehung replikationsfähiger Viren noch unwahrscheinlicher zu machen. Dazu wurden Basen in der U3 Region der 3'LTR des Transfervektors entfernt. Die dadurch entstehenden Viren bewirken während der reversen Transkription, dass die 5'LTR nach Integration in die Wirts-DNA inaktiviert wird. Diese sogenannten Selbst-Inaktivierende-Vektoren (SIN-Vektoren) sind daher vollständig abhängig von einem internen Promotor [59, 65-67].

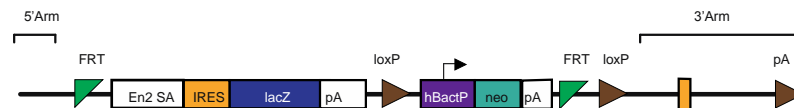
In dieser Arbeit wurden zwei lentivirale Vektorkonstrukte nach oben beschriebenem Prinzip hergestellt (Abb. 2). Ein Vektor enthielt als Transgen *Pfkl* und wurde für dessen Überexpression genutzt. Der andere Vektor diente als Kontrollvektor und enthielt das Gen hCD2. Das Gen hCD2 kodiert für ein humanes Oberflächenantigen, welches sich gut in der DFZ anfärben lässt. Beide Konstrukte enthalten einen CMV Promotor [68] sowie das Element IRES. Dieses ermöglicht die Ko-Expression eines Gens von Interesse und eines fluoreszierenden Proteins zur Detektion einer erfolgreichen Transduktion in der DFZ [69]. Als weitere Kontrolle wurden BMDCs mit einem leeren Plasmid-Rückgrat transduziert (pseudotransduziert). Dieses Plasmid enthält keine codierende cDNA.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektorkonstrukte.**  
**1. CMV\_ *Pftk1* \_IRES\_ ZsGreen. 2. CMV\_ *hCD2* \_IRES\_ ZsGreen.**

### 2.6.2 Gen-Knockout

Für weiterführende Analysen von *Pftk1* wurden BMDCs aus *Pftk1*-KO-Mäusen verwendet. Der hier verwendete KO basiert auf dem "Knockout-First" Konstrukt. Hierbei kommt das sogenannte "Genfallen-Prinzip" zur Anwendung (Abb. 3). Es wird eine sogenannte "Splice Akzeptor Kasette" in das Intron eines intakten Gens integriert. Dadurch wird ein Gen-Knockout auf Ebene der RNA Prozessierung erreicht und das Gen kann nicht in mRNA transkribiert werden [70]. Die Mauslinie wurde über das UCDavis KOMP Repository erworben [71].



**Abbildung 3: "Knockout-First"-Konstrukt. Adaptiert von UCDavis KOMP Repository [71].**



### 3 Material und Methoden

Nur bei erstmaliger Erwähnung der Firmen werden in dieser Arbeit die Firmensitze genannt.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antikörper

Verwendete Antikörper und Färbungen für die DFZ:

Tabelle 1

<b>Spezifität (Anti-Maus-)</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Bezugsquelle</b>
CD11c	PE-Cy7	N418	BioLegend
MHCII	APC	M5/114.15.2	eBioscience
CD86	PerCP	GL-1	BioLegend

<b>Spezifität (Anti-human-)</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Bezugsquelle</b>
hCD2	PE	RPA-2.10	eBioscience

##### Färbungen in der DFZ:

Für die Unterscheidung lebender von toten Zellen wurde das *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen, BD) verwendet.

##### 3.1.2 Chemikalien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (St. Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

### 3.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, von Heraeus, Hanau), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Durchflusszytometer (FACSCantoII von BD), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), PCR-Maschine (Biometra, Göttingen), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Real-Time PCR (qPCR) Gerät (Lightcycler, Roche, Basel, Schweiz oder CFX96 Real Time System, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Ultrazentrifuge (L8-70M, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA), UV-Lampe (UVC 30, Kendro, Langenselbold), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zellzählgerät (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Krefeld), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Weitere Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

### 3.1.4 Lösungen und Medien

Tabelle 2

ACK-Puffer	8,29 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 g $\text{KHCO}_3$ 37,2 mg $\text{Na}_2\text{EDTA}$ $\text{H}_2\text{O}$ ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen, durch 0,2 $\mu\text{m}$ Filter steril filtrieren
FACS-Puffer	0,01% Natriumazid (v/v) 2% FCS (v/v) PBS
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS (PAA) ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ 0,5% FBS (v/v) 2 mM EDTA 50x TAE-buffer 242g Tris-HCl

	57,1 ml 100% (v/v) Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) H <sub>2</sub> O ad 1 l
Verdaupuffer	RPMI-1640 (PAA) 0,4 mg/ml Liberase DL 0,02 mg/ml DNase

### Medien für die Transfektion von Zellen

Tabelle 3

2xHBS	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Dihydrat pH 7,05 eingestellt mit NaOH und steril filtriert mit 0,2µm Filtern bei –20°C (≤ 6 Monate) lagern
CaCl <sub>2</sub>	2.5 M CaCl <sub>2</sub> durch 0,2 µm Filter steril filtriert bei 20 °C gelagert
HEK 293FT-Transfektions-Medium	Siehe unten HEK 293FT-Medium ohne Genitacin

Zellkultur-Medien:

Tabelle 4

HEK 293FT-Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I 10% FCS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0.1 mM Non-Essential Amino Acids (MEM) 10 mM HEPES 500 µg/ml Genitacin
BMDC-Medium	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) von Sigma-Aldrich 10% FCS (inaktiviert, v/v) 500 mM β-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 25 ng/ml GM-CSF 2 mM L-Glutamin
NIH3T3 Zell Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with Glutamax-I 10% FCS (nicht inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1% Pyruvat

Weitere Medien:

Tabelle 5

PBS	150 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 adjustiert mit 5 N NaOH
Einfriermedium	90% FBS (inaktiviert, v/v) 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

**3.1.5 Mausstämme**

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

C57BL/6

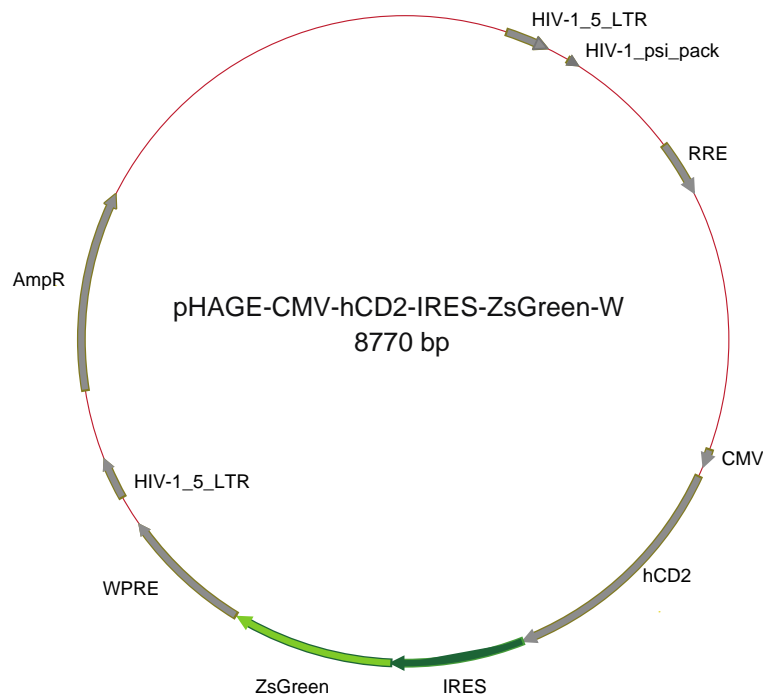
Diese Mauslinie wurde im Institut für Immunologie der LMU München gezüchtet und gehalten. H-2<sup>b</sup> ist der MHC-Haplotyp. Sie exprimieren das Allel Ly5.2. Die Mauslinie ist *Pfkl*<sup>+/+</sup> und diente als Kontrolle zu *Pfkl* KO Mäusen. Zusätzlich wurden Zellen aus dem Knochenmark dieser Mäuse in Kultur genommen und für die lentivirale Transduktion verwendet.

*Pfkl* KO Mäuse

*Pfkl*-KO Mäuse wurden über das UC Davis KOMP Repository erworben [71], siehe 2.6.2. Hierbei wurde das Konzept des Knockout-first Konzepts angewendet um *Pfkl* defiziente Mäuse zu erhalten.

**3.1.6 Lentivirale Vektoren**

Das von David Baltimore hergestellte Rückgrat *pHAGE-CMV-hIL7-IRES-ZsGreen-W* wurde von Addgene bezogen [72]. Durch einen Verdau mit Restriktionsenzymen wurde hIL7 entfernt und durch das Gen *Pfkl* bzw. hCD2 mittels Ligation ersetzt.



**Abbildung 4: Bildliche Darstellung des Vektorrückgrats (pHAGE-CMV-hCD2-IRES-ZsGreen-W, Addgene Plasmid # 26532, von David Baltimore, [72]).**

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Centricon Filter (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

Einmal-Spritzenfilter (0,2 + 0,45 µm) (Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA)

Flaschenfilter (Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA)

Einmal-Injektionskanülen 26 G '1/2' (Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan)

Einmalspritzen 1 und 5ml (Braun, Melsungen)

Reaktionsgefäße 0,2 ml (Nunc, Wiesbaden)

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)

Reaktionsröhrchen 5 ml (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA)

Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Greiner, Frickenhausen)

Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA)

Sonstige Zellkulturmaterialien und Plastikwaren stammen von den Firmen Falcon, Becton Dickinson (Franklin Labs. NJ, USA), Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Mithilfe der Elektrophorese ist es möglich Moleküle in einem elektrischen Feld zu trennen und zu analysieren. Die großporigen Agarosegele sind optimal für die Trennung von DNA geeignet. Durch den Vergleich mit DNA Strängen bekannter Größe, kann ihre Größe und Masse bestimmt werden.

Damit konnte die Qualität der DNA, die für die Produktion der lentiviralen Vektoren benötigt wurde, beurteilt werden.

Als Standard diente hier eine 100 bp und eine 1 kbp DNA Leiter (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA,USA). Das Gel enthielt Agarosekonzentrationen zwischen 1% und 2%. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarosepulver abgewogen und in 120 ml TAE Puffer durch 3-maliges kurzes Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Der DNA bindende Farbstoff Ethidiumbromid wurde im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Das flüssige Gel wurde in die Kammer gegossen und der Kamm für die Ladetaschen hineingesteckt. Vor dem Laden der DNA Proben wurden diese mit dem DNA Ladepuffer gemischt und die Elektrophoresekammer mit TAE Puffer aufgefüllt. Dann wurde eine konstante Spannung von 80 Volt angelegt. Die Auswertung erfolgte unter UV Licht (312 nm, Intas, Goettingen, Germany) mittels Fotodokumentation.

#### **3.2.1.2 Bakterielle Flüssigkulturen**

Bakterien wurden für Flüssigkulturen in LB-Medium (Roth, Karlsruhe) mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert und in einem Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 37 ° C gehalten. Die verwendeten Plasmide und Vektoren enthalten als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen.

#### **3.2.1.3 Glycerolkulturen**

Um Bakterien länger zu lagern wurden Glycerolkulturen (50% Glycerollösung mit einer Übernachtskultur in LB Medium) angelegt und bei -80 ° C tiefgefroren.

### 3.2.1.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA und RNA

Die folgenden Kits wurden gemäß den Herstellerangaben benutzt. Alle Kits wurden von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen. Isolierte DNA wurde in endotoxinfreiem Wasser gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformiertem *E.coli*:

QIAprep Spin Miniprep Kit

Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA:

QIAfilter Plasmid Maxi Kit

Isolierung genomischer DNA:

DNeasy Blood & Tissue Kit

Isolierung von RNA:

RNeasy Mini Kit

### 3.2.1.5 Messung der Nukleinsäure Konzentration

Um die Konzentrationen von DNA und RNA zu bestimmen wurde ein Spektralphotometer benutzt (NanoDro, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dazu wurde die Adsorption bei 260 und 280nm gemessen.

### 3.2.1.6 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Für die Qualitätskontrolle der Plasmid-DNA wurden Plasmide mit Hilfe von Restriktionsenzymen (New England Biolabs (NEB), Ipsich, MA, USA) geschnitten und dann mittels Agarosegelelektrophorese beurteilt.

Reaktionsansatz Kontrollverdau:

2 $\mu\text{l}$	DNA
0,3 $\mu\text{l}$	Enzym 1 (EcoRI)
0,3 $\mu\text{l}$	Enzym 2 (BamHI)
2 $\mu\text{l}$	Puffer
0,2 $\mu\text{l}$	BSA
ad 20 $\mu\text{l}$	destilliertes Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

anschließend Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde.



### 3.2.1.7 Transformation chemokompetenter *E.coli* Bakterien mittels $\text{CaCl}_2$ -

#### Methode

Mittels Transformation kann fremdes genetisches Material in Bakterien eingebracht werden. Dies diente zur Vervielfältigung von DNA welche später isoliert und zur Herstellung lentiviraler Vektoren genutzt wurde, siehe 3.2.2.6.

Für die Re-Transformation wurden die Bakterien „SoloPack Gold Competent Cells“ von Stratagene verwendet. 1 µl DNA wurde auf die gefrorenen Zellen (100 µl) gegeben und dieses Gemisch 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 45 Sekunden dauernde Inkubation bei 45 ° Celsius in einem Thermoblock. Nach diesem Schritt wurde 1 Minute auf Eis inkubiert und die Bakterien dann auf LB Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert (7,5 g Agar/500 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin). Die transformierten Bakterien wurden über Nacht in einen Inkubator mit 37 ° Celsius gestellt.

### 3.2.1.8 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Mithilfe der PCR können *in vitro* DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

In dieser Arbeit kam die RT-qPCR zum Einsatz. Grundsätzlich funktioniert die qPCR nach ähnlichen Prinzipien wie die herkömmliche PCR. Spezifische Primer werden dazu genutzt kurze, genau definierte DNA Fragmente zu vervielfältigen. Ein Vorteil der qPCR ist, dass sie mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit eine Quantifizierung gewonnener DNA Fragmente ermöglicht. Hierzu wurde Syber Green genutzt. Der Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Dies wurde hier für die Bestimmung des Virentiters genutzt. Dies ist wichtig um BMDCs mit der optimalen Menge an lentiviralen Vektoren zu transduzieren.

Zu Analyse des Virentiters wurden NIH3T3 Zellen, siehe 3.2.2.9 mit Lentiviren transduziert und 2 Tage später die genomische DNA mittels des DNeasy Blood and Tissue Kit isoliert. Unter zur Hilfenahme des Qubit Standard Curve Preparation Kit wurde die Standardkurve mit Plasmid-DNA des lentiviralen Vektors FugW, sowie eines *Bdnf*-kodierenden Bluescriptvektors erstellt. Zu Erstellung der Standardkurven wurden Verdünnungsreihen der DNA mit bekannter Konzentration angefertigt. Für die qPCR wurde nach Herstellerangaben das Lightcycler FastStart DNA Master PLUS SYBER Green I Kit (Roche) genutzt. Die Primern LTR-vorwärts 5'-TGAAAGCGAAAGGGAAACCA-3' und LTR-revers 5'-CCGTGCGCGCTTCAG-3' wurden zur Analyse der Integration des viralen Genoms genutzt. Ein Teilstück des *brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)* Gens wurde zusätzlich amplifiziert. Dazu

wurden die Primer *bdnf*-vorwärts 5'-ACGACATCACTGGCTGACAC-3' und *bdnf*-revers 5'-CATAGACATGTTTGCGGCATC-3' verwendet. *Bdnf* ist als Einzelkopie-Gen vorhanden. Anhand der Kopienanzahl von Vektor zu Kopienzahl von *Bdnf* kann quantifiziert werden.

#### Reaktionsansatz:

1,5 µl Primer vorwärts (BDNF 2 µl)

0,5 µl Primer revers (BDNF 2 µl)

7,5 µl 1x Master SYBR Green I mix

5 µl DNA

ad 20 µl H<sub>2</sub>O

#### PCR-Einstellungen:

Schritt 1: 95°C 10 min

Schritt 2: 95°C 10 sec

Schritt 3: 60°C 10 sec

Schritt 4: 72°C 10 sec zurück zu Schritt 2 (40 Zyklen)

Schritt 5: 95°C 10 sec

Anschließend erfolgte eine absolute Quantifizierung und folgende Formeln wurden verwendet:

$$\text{Virustiter } \left(\frac{\text{TU}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{NIH3T3 Zellzahl} \times \text{Anzahl Viruskopien pro Genom}}{\text{Virusvolumen (ml)}}$$

$$\text{Multiplicity of infection (MOI)} = \frac{\text{Virusvolumen (ml)} \times \text{Virustiter } \left(\frac{\text{TU}}{\text{ml}}\right)}{\text{Zellzahl}}$$

### 3.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl transduzierter HEK 293FT oder NIH 3T3 Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zu 50 µl Zellsuspension wurden 50 µl Färbelösung (Trypanblau) hinzugefügt. Damit können lebende, ungefärbte von toten, gefärbten Zellen unterschieden werden. Unter dem Mikroskop wurde die Zahl der Trypanblau-negativen Zellen in allen Quadranten gezählt und folgendermaßen die Zellzahl berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert der Zellzahlen pro Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Alle primären Zellen wurden mit Hilfe des CASY-Zähler (CASY cell counter and analyzer, OMNI life science, Bremen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers gezählt.

#### 3.2.2.2 Cytometric Bead Array

Zur Messung von Zytokinen im Überstand von GM-CSF BMDC-Kulturen wurde das Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit (BD Bioscience) genutzt. Dazu wurde der Überstand an Tag 8 der GM-CSF-BMDC Kultur von Zellen mit und ohne Stimulation durch LPS und Poly I:C abgenommen und bei – 20 ° C eingefroren. Um eine optimale Konzentration der Proben für das Assay zu erhalten wurden die Proben teilweise titriert (1:1, 1:2). Mit diesem Kit können bis zu 6 Zytokine gleichzeitig in einer Probe gemessen werden. Partikel mit spezifischen Antikörpern für Interleukin-6 (IL-6), IL-10, Monocytic chemotactic protein 1 (MCP-1), Interferon gamma (IFN-γ), Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-12p70 erkennen die Zytokine im Überstand und werden dann mit einem sekundären PE-konjugierten Antikörper inkubiert. Der Versuchsablauf erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Proben und die Standardkurve wurde mit FACSCantoII aufgenommen und die Daten mit der FCAP Array Software (Soft Flow Inc.) ausgewertet.

#### 3.2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (DFZ) ermöglicht eine Analyse der physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen. Das Grundprinzip dieser Methode ist, dass einzelne Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einen Laserstrahl geeigneter

Wellenlänge passieren. Dabei wird die Lichtbeugung und Streuung der Zellen detektiert. Zusätzlich dazu kann man Fluoreszenzfarbstoffe messen. Dies geschieht nach dem Prinzip der Antigen-Antikörperbindung. An Antikörper gekoppelte Fluorophore emittieren Fluoreszenzlicht, welches von Photomultipliern detektiert wird. Die Antikörper binden an bestimmte Bestandteile der Zelle, wie beispielsweise Oberflächenantigene. Andere Farbstoffe interkalieren intrazellulär mit der DNA. Damit können verschiedene Eigenschaften der Zelle analysiert werden und verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Verschiedene Marker können detektiert werden, sofern sich die emittierten Wellenlängen der eingesetzten Fluorophore unterscheiden.

Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser und verschiedener Filter kann die Anzahl einsetzbarer Farbstoffe erhöht werden. Die Ergebnisse werden durch die Gerätesoftware graphisch dargestellt. Der Untersucher kann zwischen verschiedenen Darstellungsoptionen wählen. Herkömmliche Darstellungsweisen sind das Histogramm und der Dot Plot.

Alle Durchflusszytometriedaten wurden mit dem FACSCantoII™ Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit 3 Lasern (488, 633 und 405 nm) erhoben. Die Daten wurden mit der FlowJo-Software (TreeStar, Ashland, OR, USA) analysiert.

#### **3.2.2.4 Färbung der Zellen für die DFZ**

Für die DFZ wurden circa  $1,5 \times 10^6$  Zellen in einem 5 ml Probengefäß einmal mit 1 ml FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 50 µl Antikörpermischung in FACS Puffer gemischt und 20 Minuten bei 4 ° C inkubiert. Durch Titration war für jeden Antikörper zuvor die richtige Konzentration ermittelt worden. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml FACS Puffer um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 2% Formaldehyd in FACS Puffer fixiert und lichtgeschützt auf Eis gelagert.

#### **3.2.2.5 Gewinnung von murinem Knochenmark und BMDC Kultur**

Zur Knochenentnahme wurden Mäuse in einer CO<sub>2</sub> Kammer euthanasiert. Nach Ethanoldeinfektion von außen wurden beide Ober- und Unterschenkelknochen mittels Skalpell, Schere und Pinzette entnommen. Die Knochen wurden in PBS gelagert.

Zur Gewinnung des Knochenmarks und zum Anlegen einer BMDC Kultur wurden Femur und Tibia komplett von den Muskeln und Sehnen befreit. Femurkopf und Femurschaft wurden abgeschnitten und das Knochenmark mit einer Spritze (20 ml, Braun) mit einer  $0,45 \times 12$  mm Nadel und RPMI Medium in eine Zellkulturplatte (10cm) gespült. Mit der Tibia wurde ebenso verfahren.

Nach einmaligem Zentrifugieren bei 1300 rpm (5 min) wurde eine Erythrozytenlyse mit 2 ml ACK Puffer durchgeführt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit RPMI Medium gestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert und anschließend in 5ml Medium resuspendiert.

Für die GMCSF-BMDC Kultur wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in einer  $10 \text{ cm}^2$  Zellkulturschale ausplattiert und in 10 ml BMDC Medium im 5%  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Das Zytokin GM-CSF wurde hinzugefügt um die Vorläuferzellen zur *in vitro* Differenzierung zu DCs anzuregen.

### 3.2.2.6 Herstellung lentiviraler Vektorüberstände

Die lentiviralen Vektoren für die spätere Transduktion der BMDC Kulturen, wurden mittels Transfektion von HEK 293 FT Zellen generiert, siehe 3.2.2.10.

Circa 19 Stunden vor der geplanten Transfektion wurden  $4,5 \times 10^6$  Zellen pro Zellkulturschale (surface coated, Durchmesser:10 cm) in 10 ml HEK 293 FT Medium ohne Geneticin ausplattiert. Pro Virus wurden 20 Zellkulturschalen benötigt.

Am Tag der Transfektion wurde überprüft, ob die Zellen ungefähr 90% konfluent wachsen. Dies schafft optimale Bedingungen für die Transfektion. Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht.

Transfektionsmix pro Platte:

100  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$

10  $\mu\text{g}$  Hüllplasmid pMD2G (kodiert für VSV-G)

15  $\mu\text{g}$  Verpackungsplasmid pCMV $\Delta$ 8.2 (PAX 2)

20  $\mu\text{g}$  Transfervektor

ad 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Im Anschluß wurde 1 ml HeBS Puffer zum Transfektionsgemisch gegeben und gemischt, damit die DNA präzipitiert und später von den HEK 293 FT Zellen gut aufgenommen werden kann. Wichtig hierfür war eine Inkubationszeit von 15 Minuten. Auf jede Zellkulturplatte wurden 10  $\mu\text{l}$  Chloroquin gegeben. Dies sorgt dafür, dass die DNA nicht in den Lysosomen der Zellen zerstört wird.

Dann wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellkulturplatten gegeben und geschwenkt. Die Zellkulturplatten wurden für 5 Stunden bei 37 ° C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach dieser Zeitspanne wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und frisches HEK 293 FT Medium hinzugefügt. Über Nacht verblieben die Zellen erneut bei 37 °C im 10% CO<sub>2</sub>-Inkubator.

Die Virusüberstände wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion gesammelt und jeweils durch einen 22 µm Filter gefiltert. Anschließend wurde 10 ml frisches HEK 293 FT Medium zu den Zellen gegeben. Nach der 3. Abnahme des Überstands wurde der Virus mittels des Centricon Filters (Plus-80, Millipore, Billerica, MA, USA) konzentriert. Nach einmaligen Waschen mit dH<sub>2</sub>O wurde in den Filter 60 ml Virusüberstand eingefüllt und 30 Minuten bei 4300 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis für jeden Virus der gesamte Überstand filtriert war. Durch die Membran des Filters (Obergrenze der Membran sind Moleküle mit 100 kDa Molekülmasse) können die hochmolekularen Moleküle des Virus nicht hindurch, während kleinere Moleküle hindurchgehen. Dadurch kann der Virus hoch konzentriert werden. Zum Schluss wurde der Virus in Cryotubes abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 ° C gelagert.

### **3.2.2.7 Magnetische Zell-Separation**

Diese Methode dient der Isolation von Zellpopulationen. Dies wird dadurch erreicht, dass spezifische Antikörper an die gewünschten Zellen binden. An die Antikörper sind paramagnetische Partikel gebunden. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine magnetische Säule bleiben nur die Zellen mit magnetischer Markierung in der Säule zurück. Dies nennt man positive Isolation. Bei der negativen Isolierung werden unerwünschte Zellen markiert und der Durchfluss enthält die gewünschten Zellen.

Mit dem Lineage Depletion Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) können Zellen indirekt magnetisch markiert werden. Aus dem Knochenmark von Mäusen wurden Zellen gewonnen. Mit diesem Kit sollten unreife hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen angereichert werden und die reifen hämatopoetischen Zellen verworfen werden, um später eine möglichst reine Kultur DCs zu erhalten.

Dazu wurde die Zellsuspension zuerst mit biotinylierten Antikörpern inkubiert, diese sind gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a). Diese Oberflächenantigene sind spezifisch für bestimmte Zelllinien wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, DCs,

Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten. Als nächster Schritt wurden gegen Biotin gerichtete Antikörper hinzugegeben an die magnetische Partikel gebunden sind.

Die Antikörper binden an das Biotin und die Zellen sind magnetisch markiert.

Nun wurde die Zellsuspension in eine magnetische Säule gegeben und die reifen magnetisch markierten Zellen wurden dadurch in der Säule zurückgehalten. Der Durchfluss wurde gesammelt um damit eine GM-CSF BMDC Kultur zu beginnen.

### **3.2.2.8 Transduktion einer BMDC Kultur**

Die BMDC Kultur wurde wie in 3.2.2.5 beschrieben angelegt. Abhängig von verschiedenen Protokollen wurden die Zellen dann an Tag 1, Tag 2 oder Tag 6 der Zellkultur transduziert. Dazu wurden die Lentiviren (Herstellung in 3.2.2.6 beschrieben) auf Eis aufgetaut. Die BMDCs wurden durch pipettieren und Waschen mit PBS von den Zellkulturplatten gelöst und anschließend zentrifugiert, in Medium resuspendiert und gezählt. Das Transduktionsgemisch wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Dafür wurden pro Reaktionsgefäß  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt und Polybrene im Verhältnis 1:500 und die entsprechende Menge Virus, abhängig vom ermittelten Titer, siehe 3.2.2.9. Anschließend wurde mit GM-CSF BMDC Medium auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Dann wurde je Virus 500 µl Transduktionsgemisch in 24 Well Platten ausplattiert, mit Parafilm umwickelt und bei 32 ° C bei 1300 rpm für 2 h zentrifugiert.

Die 24 Well Platten wurden nach dem Zentrifugieren 4 Stunden bei 37 ° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS vorsichtig gewaschen und in 50 ml Reaktionsgefäße gespült und verblieben 10 Minuten im Kühlschrank. Die auf den 24 Well Platten verbliebenen Zellen wurden mit Trypsin gelöst (1 Minute bei 37 ° C und 5% CO<sub>2</sub>) und dann zu den Zellen im Kühlschrank dazugegeben.

Anschließend wurden die Zellen bei 1300 rpm 5 Minuten zentrifugiert und in 3 ml GM-CSF BMDC Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf 6 Well Platten ausplattiert und bei 37 ° C im 5% CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

Teile der BMDCs wurden als untransduzierte Zellsuspension als Kontrollzellen genutzt. Hierfür wurden die Zellen auf 6 Well Platten in 3 ml GM-CSF BMDC Medium ausplattiert und im 5% CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

Im Verlauf erfolgte eine Analyse der Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie.

Teilweise erfolgte einen Tag nach der Transduktion eine Stimulation der Zellen mit LPS bzw. Poly I:C. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 2 µg/ml LPS oder 2,5 µg/ml Poly I:C stimuliert.

### 3.2.2.9 Transduktion von NIH3T3 Zellen für die Virustitration

19 Stunden vor der Transduktion wurden  $4 \times 10^4$  NIH3T3 Zellen in 24 Well-Platten in 1 ml Medium ausplattiert. Pro Virus wurden 5 Wells benötigt und 2 zusätzliche um die Zellen zu zählen. Am nächsten Tag wurden 5 verschiedene Verdünnungen pro Virus angelegt. Dazu wurde zu dem NIH3T3 Medium Polybrene 1: 500 (Hexadimethrin Bromid, Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Dann wurden Virusverdünnungen von 1:50, 1:250, 1:1250, 1:6250, 1:31250 angelegt. Die Verdünnungen wurden mit polybrenehaltigem Medium auf 1 ml Volumen aufgefüllt.

Dieses Gemisch wurde auf die vorher abgesaugten NIH3T3 24-Well-Zellkultur-Platten gegeben, mit Parafilm umwickelt und bei 1300rpm 2 Stunden bei 32 ° C zentrifugiert. Es folgte eine 4-stündige Inkubation bei 37 ° C und 10% CO<sub>2</sub>. Nach 4 Stunden wurden das Medium von den Platten abgesaugt und die Platten mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches NIH3T3 Medium hinzugegeben. Die 2 zusätzlichen Wells wurden wie oben beschrieben in der Neubauerzählkammer gezählt, siehe 3.2.2.1. Die Zellzahl wird für die Ermittlung des Titters benötigt. Zwei Tage später erfolgte dann eine qPCR (siehe 3.2.1.8).

### 3.2.2.10 Zellkultur

#### Kultivierung von NIH3T3 Zellen

Diese Standard Fibroblastenzelllinie wurde dazu genutzt um Virustitrationen durchzuführen (siehe 3.2.2.9). Die Zellen wurden in 10 ml NIH3T3 Medium in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 ° C in einem 10% CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Bei Bedarf und mehr als 80% konfluentem Wachstum wurden die Zellen circa alle 2 Tage geteilt (1:10) und in neue Kulturflaschen überführt, siehe Vorgehen bei HEK 293 FT Zellen.

#### Kultivierung von HEK 293 FT Zellen (Invitrogen)

Diese Zelllinie ist ein Transformationsprodukt menschlicher Nierenzellen mit DNA Teilen des menschlichen Adenovirus 5 [73, 74]. Die HEK 293 FT Zellen eignen sich besonders gut für die Herstellung lentiviraler Vektoren, da sie zusätzlich das SV40 large T Antigen exprimieren, dessen Replikationsursprung die Replikation episomaler Plasmide erlaubt [74]. Die Zellen wurden in 10 ml HEK 293 FT Medium in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 ° C in einem 10% CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Bei Bedarf wurden sie alle 2-3 Tage geteilt (1:5) und in neue Kulturflaschen überführt. Dafür wurde das Medium verworfen und mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit 4 ml Trypsin inkubiert und gelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit 6 ml



Medium neutralisiert. Anschließend wurden die Zellen in mehrere Zellkulturflaschen verteilt und mit 40 ml Medium kultiviert.

Beide Zelllinien wurden zur Lagerung in 1 ml FCS mit 10% DMSO eingefroren und bei  $-180^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Kultivierung von DCs (BMDC Kultur)

Siehe 3.2.2.5.

### **3.2.3 Statistik**

Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Signifikanztests (Student's T-Test und One-Way-Anova) wurden mit dem Programm Prism (Version 5,0b. GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fragestellung

Die Rolle des Gens *Pfkl* in DCs ist bisher weitestgehend ungeklärt. Edelmann *et al.* 2011 [3] hatte in vergleichenden Promotoranalysen gezeigt, dass das Gen *Pfkl* in DCs exprimiert wird und mit der Expression des Oberflächenantigens CD11c in DCs korreliert. PCR mRNA Analysen zeigen, dass das Gen vor allem in CD8<sup>+</sup> DCs exprimiert wird [3]. Dies zeigt sich auch in Daten des "immunologic genome project" [75]. Bisherige Analysen deuten auf eine Rolle von *Pfkl* im Zellzyklus hin [47]. Das Gen wird aber auch in postmitotischen Zellen exprimiert, was auf weitere Funktionen außerhalb des Zellzyklus hindeuten könnte [51]. *Pfkl* wird bereits in Vorläuferzellen aus dem Knochenmark exprimiert und zeigte eine konstante Expression während der Entwicklung von DCs in einer Zellkultur mit GM-CSF. Allerdings wird *Pfkl* nach Stimulation der DCs mit LPS herunter reguliert [3]. Dies könnte ein Anhalt dafür sein, dass *Pfkl* eine Rolle bei der Ausreifung von DCs spielt.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss des Gens auf die Ausreifung von DCs zu untersuchen: Oben genannte Daten ließen die These aufkommen, dass eine konstante Überexpression von *Pfkl* möglicherweise eine verminderte Ausreifung der BMDCs bewirken könnte, während ein KO des Gens möglicherweise eine verstärkte Ausreifung zur Folge haben könnte. Aufgrund dieser Überlegungen wurde eine Funktionsanalyse des Gens anhand von Überexpression und Gen-KO angestrebt.

In einem ersten Teil ging es um die Entwicklung einer Methode zur Überexpression des Gens *Pfkl* in BMDCs. Es sollte eine Methode zur Überexpression des Gens durch lentivirale Transduktion in murinen DCs etabliert werden. Hierfür wurden lentivirale Vektoren hergestellt und dann dazu genutzt um BMDCs zu transduzieren und damit das Gen *Pfkl* zu überexprimieren. Dies erforderte die Etablierung eines geeigneten und funktionierenden Transduktionsprotokolls.

In einem zweiten Teil ging es um die Anwendung und Auswertung dieser Methode. Untersucht werden sollte dabei vor allem der Einfluss des überexprimierten Gens *Pfkl* auf die phänotypische und funktionelle Ausreifung von BMDCs.

In einem dritten Teil wurde der Einfluss des Gens *Pfkl* auf die Differenzierung und Ausreifung von DCs anhand von BMDCs aus einer *Pfkl* KO Maus untersucht.

## 4.2 Entwicklung einer Methode zur Überexpression von *Pfkl*

### 4.2.1 Herstellung lentiviraler Vektoren und Transduktion von DCs

Die Überexpression des Gens *Pfkl* in BMDCs erforderte zu Beginn die Herstellung der lentiviralen Vektoren mittels Calciumphosphat-Transfektion (Abb. 5 A).

Eine vereinfachte schematische Darstellung des lentiviralen Vektors *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen ist in Abbildung 5B dargestellt (im Folgenden als *Pfkl*-Vektor bezeichnet). Der lentivirale Vektor hCD2\_IRES\_ZsGreen (im Folgenden als hCD2-Vektor bezeichnet) diente als Kontrolle. BMDCs wurden mit diesem Kontroll-Lentivirus transduziert um mögliche Effekte der lentiviralen Transduktion von Effekten der *Pfkl* Überexpression besser abgrenzen zu können. Die lentiviralen Vektorkonstrukte enthalten außer dem Transgen (*Pfkl* bzw. hCD2) zusätzlich das fluoreszierende Protein ZsGreen. Dieses dient dazu erfolgreich transduzierte Zellen in der DFZ zu detektieren. ZsGreen wurde in dieser Arbeit als fluoreszierendes Protein gewählt, da Studien zeigen konnten, dass mit damit ein starkes Signal zustande kommt [76].

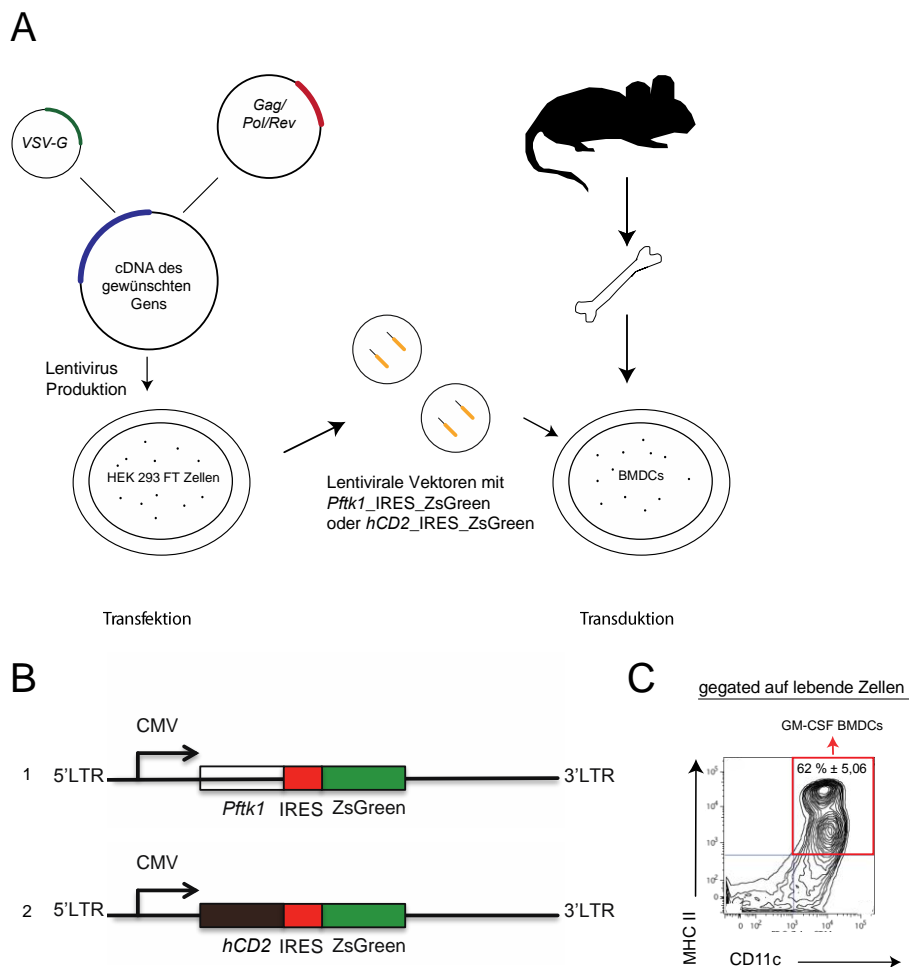
Bei der Herstellung der Vektoren wurden Titer für das Lentivirale Konstrukt mit *Pfkl* von durchschnittlich  $1,04 \times 10^9$  Inf.U./ml erreicht und Titer für das Kontrollkonstrukt mit hCD2 von  $2,05 \times 10^9$  Inf.U./ml.

Zur Gewinnung der BMDCs wurden hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen gewonnen und *in vitro* unter Zugabe von GM-CSF kultiviert. Diese Zellkultur wurde anschließend mit dem lentiviralen *Pfkl*-Vektor transduziert (siehe 3.2.2.8) und in der DFZ analysiert (im Folgenden als *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen bezeichnet). Als Kontrolle wurden Zellen aus denselben Kulturbedingungen mit dem lentiviralen hCD2-Vektor transduziert (im Folgenden als hCD2-Kontrolle bezeichnet (Abb. 5A und 5B)). In allen durchgeführten Experimenten wurde eine ähnliche Multiplizität der Infektion (MOI) verwendet. Als weitere Kontrolle dienten pseudo-transduzierte Zellen, hierbei handelt es sich um BMDCs, die mit einem leeren Plasmid-Rückgrat ohne cDNA eines gewünschten Gens transduziert wurden. Als weitere Kontrolle dienten nicht transduzierte BMDCs.

Zur Abgrenzung der BMDCs von anderen Zellen in der Kultur wurden CD11c und MHCII positive Zellen in der DFZ ausgewählt (Abb. 5C). Zuvor wurde mithilfe von "forward scatter" und "sideward scatter" lebende Zellen selektiert und Dupletten

ausgeschlossen. Für die Unterscheidung lebender von toten Zellen wurde das *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen, BD) verwendet. Der Farbstoff gelangt in das Zytoplasma toter Zellen und reagiert mit Aminen. Die Zellmembran lebender Zellen kann jedoch nicht passiert werden [77].

In einer GM-CSF Kultur mit untransduzierten Zellen aus dem Knochenmark einer C57BL/6 Maus entwickelten sich durchschnittlich 62% der Zellen zu  $CD11c^+$  MHCII<sup>+</sup> BMDCs (Zellen kultiviert nach Protokoll 3: Anlegen einer GM-CSF-BMDC-Kultur, durchflusszytometrische Analyse an Tag 8 (Abb. 6A3)).



**Abbildung 5: Herstellung lentiviraler Vektoren mittels  $Ca_2PO_4$ -Transfektion und lentivirale Transduktion von BMDCs zur Überexpression des Gens *Pfk1*:**

(A) Die Herstellung der Vektoren erfolgte mittels  $Ca_2PO_4$ -Transfektion von HEK 293 FT Zellen: Es erfolgte die Zugabe des Transfektionsgemisches bestehend aus Verpackungsplasmid (*Gag/Pol/Rev*), Hüllplasmid (*VSV-G*) und Transfektor (cDNA) nach circa 19 stündiger Kultivierung der 293 FT Zellen. Die Überstände wurden nach 24 h, 48 h und 72 h abgenommen und anschließend durch Filtration konzentriert. Die lentiviralen Vektoren wurden für die Transduktion hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der C57BL/6 Maus genutzt.

(B) Vereinfachte schematische Darstellung der lentiviralen Vektorkonstrukte.

(C) Ein repräsentativer FACS Plot zeigt das *Gating* zur Selektion von BMDCs. Dafür wurden die Oberflächenantigene CD11c und MHCII genutzt. Die Zellen wurden durch Kultur von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen unter Zugaben von GM-CSF gewonnen. Die Zahlen zeigen den durchschnittlich erreichten Prozentsatz an DCs  $\pm$  SEM für Daten von n=3 unabhängigen Experimenten, die nach Protokoll 3 (Abb. 6 A) kultiviert worden sind.

#### 4.2.2 Testung verschiedener Transduktionsprotokolle

Für die erfolgreiche Überexpression eines Gens mittels lentiviraler Vektoren können Transduktionszeitpunkt sowie die Kulturbedingungen eine wesentliche Rolle spielen [4].

Ziel dieser Arbeit war es ein optimales Transduktions- und Kulturprotokoll für eine lentivirale Überexpression von *Pfkl* in BMDCs zu finden.

Analysiert wurden drei verschiedene Protokolle, die sich vor allem bezüglich des Transduktionszeitpunktes unterscheiden (Abb. 6A). Protokoll 1 sieht eine frühe Transduktion der Zellen an Tag 2 der Zellkultur vor mit anschließender Analyse in der DFZ an Tag 8. Bei Anwendung des 2. Protokolls werden die Zellen bereits an Tag 1, nach einer Anreicherung der BMDCs mithilfe magnetischer Zellseparation, transduziert, siehe 3.2.2.7. Zusätzlich werden die Zellen an Tag 7 der Kultur geteilt und mit neuem Nährmedium versorgt um ein überwucherndes Wachstum mit vermehrtem Zelltod zu vermeiden. Die Durchflusszytometrieanalyse erfolgt an Tag 9.

Protokoll 3 unterscheidet sich stark von den ersten beiden Protokollen, da die Zellen erst an Tag 6 der Kultur transduziert werden. Eine Erneuerung des Medium mit Aufteilung der Zellen wird an Tag 3 durchgeführt. Analysiert werden die Zellen zwei Tage nach der lentiviralen Transduktion an Tag 8 der Zellkultur.

Anhand des ZsGreen Signals in der DFZ wurde die Transduktionseffizienz der verschiedenen Protokolle bestimmt (Abb. 6B). Dadurch konnten Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Überexpression gezogen werden. In der DFZ war zuvor auf lebende MHCII<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> BMDCs selektiert worden (Abb. 5 C).

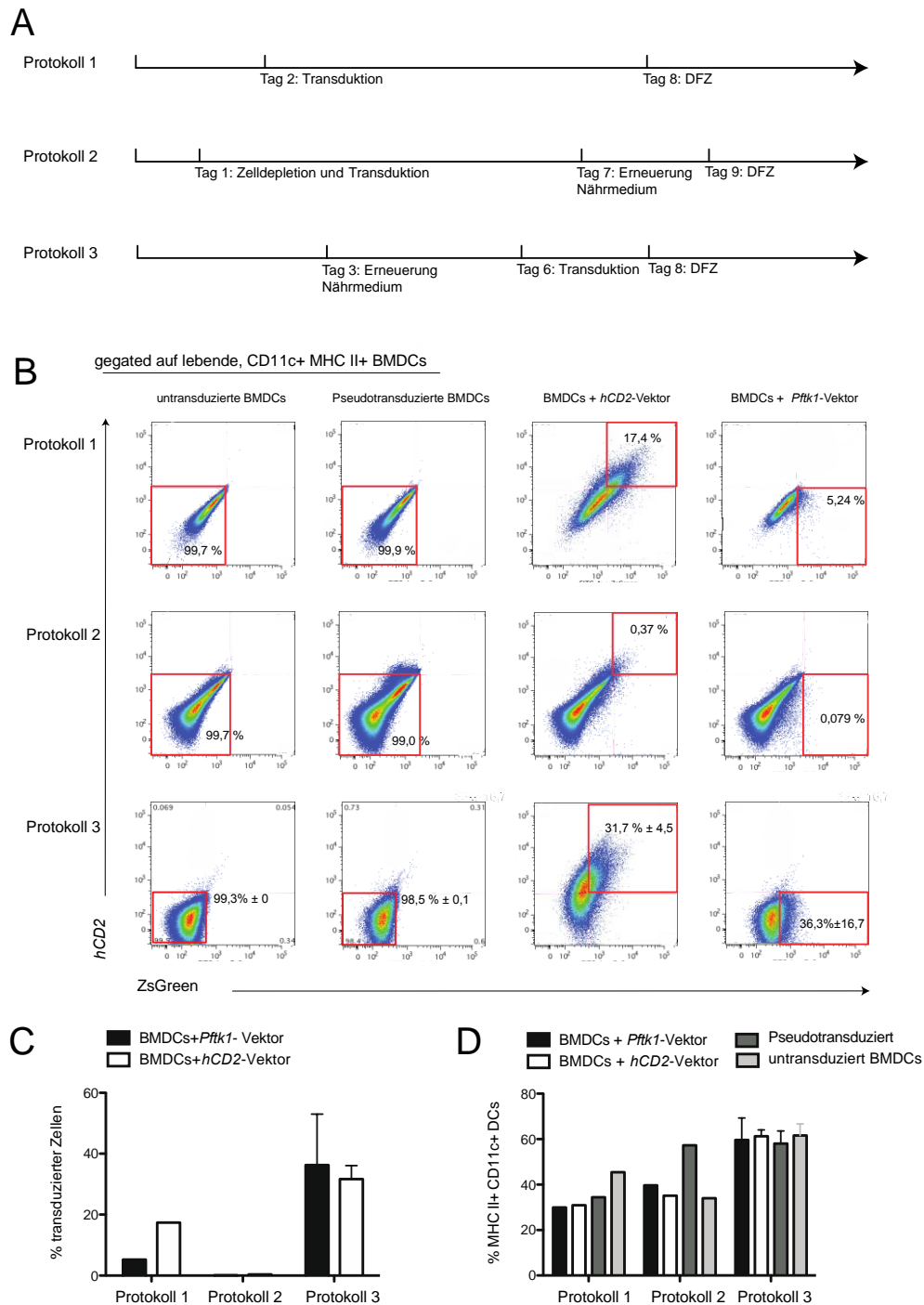
Ein Vergleich transduzierter BMDCs mit untransduzierten BMDCs ermöglichte eine Abgrenzung ZsGreen-positiver zu ZsGreen-negativen Zellen in der DFZ. Durch diese Kontrolle konnten ZsGreen-negative Zellen anhand eines Gates eingegrenzt werden. Anhand dieses Gates konnte für die transduzierten Zellen eine Selektion der ZsGreen positiven und negativen Zellen erfolgen und so der Prozentsatz erfolgreich transduzierter Zellen bestimmt werden (Abb. 6B).

Analysiert wurde das ZsGreen Signal der BMDCs, die mit dem *Pfkl*-Vektor oder mit dem hCD2-Vektor transduziert worden waren. Letztere konnten zusätzlich anhand des hCD2 Signals in der DFZ selektiert werden. Diese Zellen dienten bei der späteren

Funktionsanalyse als zusätzliche Kontrolle (im Folgenden als hCD2-Kontrolle bezeichnet). So konnten Effekte der lentiviralen Transduktion von Effekten der *Pfkl*-Überexpression unterschieden werden. Pseudotransduzierte Zellen dienten als dritte Kontrolle. Diese stellten sich wie die untransduzierten BMDCs ZsGreen negativ in der DFZ dar.

In Abb. 6B und 6C ist die Transduktionseffizienz der drei Protokolle im Vergleich dargestellt. Bei Verwendung von Protokoll 1 wurde für die mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierten BMDCs 5,24% ZsGreen positive Zellen erreicht. Für die hCD2-Kontrolle konnten etwas höhere Werte von 17,4% erreicht werden. Protokoll 2 erwies sich mit einem sehr geringen ZsGreen Signal für beide Gruppen (mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierte BMDCs und die hCD2-Kontrolle) als ungeeignet für die Transduktion und spätere Funktionsanalyse. Bei Anwendung von Protokoll 3 wurden für die mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierten Zellen durchschnittlich 36% ZsGreen positive Zellen erreicht. Für die hCD2-Kontrolle ergaben sich durchschnittlich 32% erfolgreich transduzierte Zellen. Aufgrund der höheren Transduktionseffizienz wurde Protokoll 3 für weiterführende Funktionsanalysen von *Pfkl* ausgewählt und bei allen weiteren Analysen verwendet.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit analysiert, ob die verschiedenen Protokolle einen Einfluss auf die Entwicklung der BMDCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen haben. Bezüglich der erreichten Prozentsätze an BMDCs konnte ein Unterschied zwischen den drei Protokollen detektiert werden (Abb. 6D). Bei Verwendung von Protokoll 3 entwickelten sich deutlich mehr BMDCs in der Zellkultur als bei Verwendung der anderen Protokolle, unabhängig davon ob die Zellen transduziert worden waren oder nicht.



**Abbildung 6: Vergleich der Transduktionsprotokolle 1-3 und Strategie zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen in der DFZ:**

(A) Zeitachse verschiedener Transduktionsprotokolle 1-3.

(B) Repräsentative FACS Plots zeigen die Strategie zur Selektion der Zellen, die das gewünschte Gen *Pfkl* überexprimieren bzw. das Kontrollgen *hCD2* exprimieren. Erfolgreich transduzierte Zellen konnten anhand des ZsGreen Signals im Vergleich mit untransduzierten BMDCs identifiziert werden. Die Zahlen zeigen den durchschnittlich erreichten Prozentsatz ± SEM erfolgreich transduzierter Zellen bzw. nicht transduzierter oder pseudotransduzierter Zellen für Daten von n=3 unabhängigen Experimenten für Protokoll 3. Protokoll 1 und 2 wurden jeweils einmal durchgeführt.

(C) Das Balkendiagramm zeigt den Prozentsatz erfolgreich mit dem *Pfkl*-Vektor oder *hCD2*-Vektor transduzierter Zellen für Protokoll 1 bis 3, gemessen anhand des ZsGreen Signals.

(D) Das Balkendiagramm zeigt die Prozentzahlen lebender CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> BMDCs für Protokoll 1-3 für die vier Gruppen (mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierte Zellen im Vergleich mit der hCD2-Kontrolle, im Vergleich mit nicht transduzierten Zellen und pseudotransduzierten Zellen) für alle Zellen der Kultur (vor Selektion der erfolgreich transduzierten ZsGreen positiven Zellen).

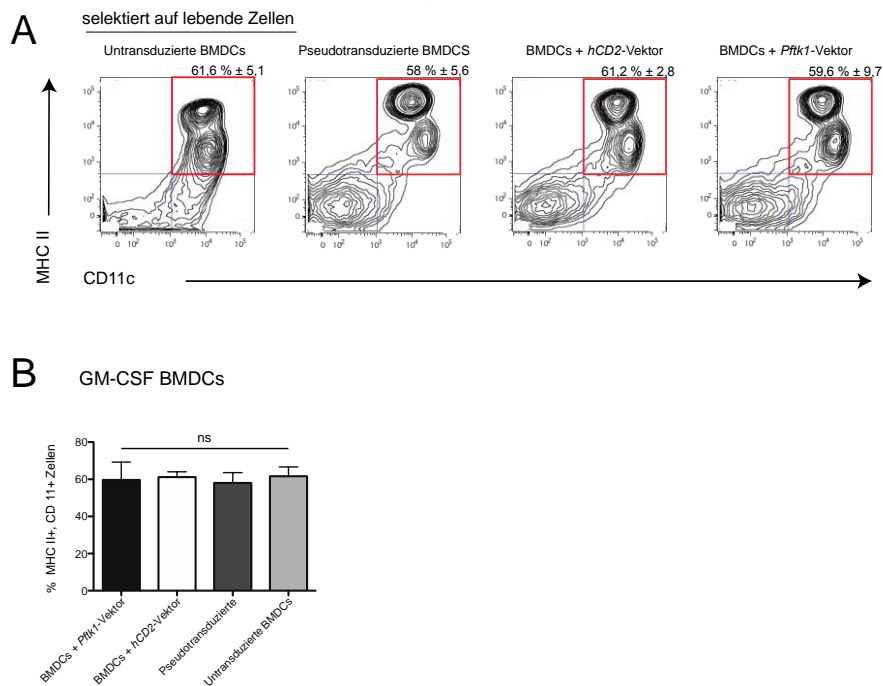
### **4.3 Funktionsanalyse von *Pfkl* - Auswirkungen der lentiviral vermittelten Überexpression von *Pfkl* auf DCs**

In diesem Abschnitt geht es um die Anwendung des 3. Transduktionsprotokolls zur Überexpression des Gens *Pfkl* und den Auswirkungen dieser Überexpression auf die Ausdifferenzierung und Ausreifung von BMDCs.

#### **4.3.1 Auswirkungen der lentiviralen Transduktion/*Pfkl*-Überexpression auf die Ausdifferenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs bzw. Homöostase der BMDCs**

Um einen möglichen Einfluss einer lentiviralen Transduktion mit dem *Pfkl*-Vektor bzw. mögliche Einflüsse des überexprimierten Gens *Pfkl* auf die sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickelnde Anzahl BMDCs zu detektieren, analysierten wir diese in der DFZ. In den Voranalysen der verschiedenen Protokolle hatten sich Unterschiede bezüglich der Prozentsätze erreichter BMDCs gezeigt (Abb. 6D). Für Protokoll 3 wurden im Gegensatz zu Protokoll 1 und 2 deutlich höhere Prozentsätze CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> BMDCs erreicht. Da für alle weiteren Analysen Protokoll 3 genutzt wurde, erfolgte hier eine genauere Untersuchung. Dazu wurden in der DFZ an Tag 8 der Zellkultur lebende CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> BMDCs untersucht. Analysiert wurde die Auswirkung der Transduktion mit dem *Pfkl*-Vektor auf alle Zellen (erfolgreich transduzierte und nicht-transduzierte Zellen einer Kultur) im Vergleich zu der hCD2 Kontrolle, nicht transduzierten Kontrollzellen und pseudotransduzierten BMDCs (Abb. 7A und 7B). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Prozentsatz sich entwickelnder BMDCs zwischen den vier Gruppen. Für alle Gruppen differenzierten sich zwischen 59% und 61% BMDCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Abb. 7).





**Abbildung 7: Einfluss der lentiviralen Transduktion mit dem *Pfk1*-Vektor auf die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs bzw. Homöostase der BMDCs:**

(A) Dargestellt sind repräsentative FACS Plots für n=3 unabhängige Experimente, gated ist auf lebende Zellen. Untersucht wird der Einfluss der lentiviralen Transduktion auf alle Zellen, sowohl die erfolgreich transduzierten und die nicht transduzierten Zellen. Die Zahlen stellen die durchschnittlich erreichte Prozentzahl  $\pm$  SEM der  $CD11c^+MHCII^+$  BMDCs dar.

(B) Das Balkendiagramm zeigt die Prozentzahlen  $CD11c^+MHCII^+$  BMDCs. Die statistische Analyse wurde mit dem One-Way Anova Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) durchgeführt.

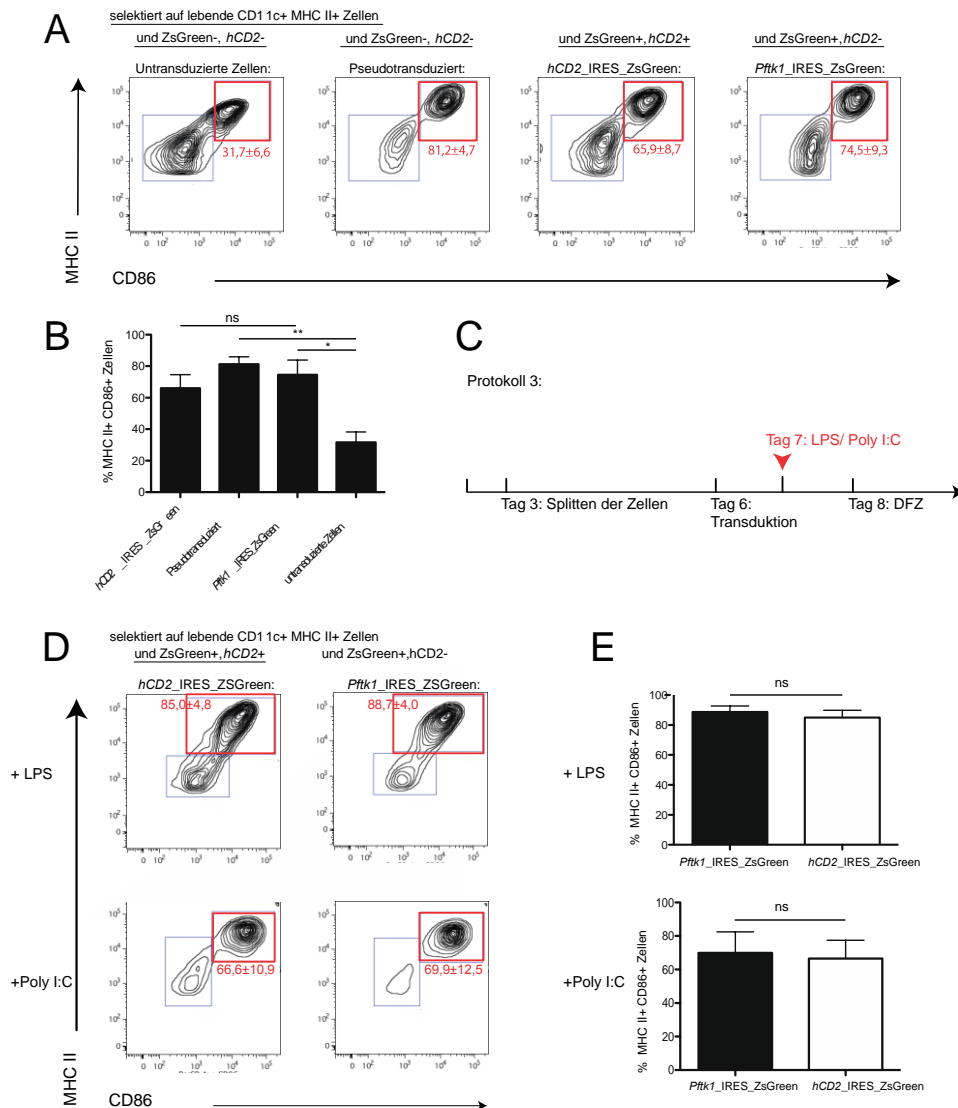
#### 4.3.2 Auswirkungen der Überexpression von *Pfk1* auf die Ausreifung von $CD11c^+MHCII^+$ BMDCs

Nachdem kein Unterschied in der Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs festgestellt worden war, wurde der Einfluss des Gens *Pfk1* auf die Ausreifung von differenzierten  $CD11c^+MHCII^+$  BMDCs untersucht. Hierfür wurde wiederum die beschriebene Methode (siehe 3.2.2.8) der lentiviralen Transduktion mit Protokoll 3 genutzt. Nach *gating* auf lebende, differenzierte DCs und anschließender Analyse der erfolgreich transduzierten BMDCs anhand des ZsGreen Signals an Tag 8 der Zellkultur sollten reife von unreiferen Zellen unterschieden werden. In dieser Arbeit wurden dazu die Marker CD86 und MHCII genutzt, die nach Stimulierung von DCs hochreguliert werden und daher als Reifungsmarker dienen (Abb. 8A) [26].

Dadurch ergaben sich für die analysierten BMDCs zwei Gruppen: ausgereifte BMDCs mit vermehrter Expression von CD86 und MHCII (MHCII<sup>high</sup>, CD86<sup>high</sup>) und weniger ausgereifte Zellen mit einer niedrigeren Oberflächenexpression dieser zwei Marker (Abb. 8A). Diese zwei Populationen wurden ausgewählt und die entsprechenden Prozentzahlen bestimmt. Anschließend wurden die Prozentzahlen der ausgereiften BMDCs (hohe Expressionslevel von CD86 und MHCII) der vier Gruppen verglichen: Verglichen wurden die mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierten BMDCs mit der hCD2-Kontrolle, den untransduzierten BMDCs und den pseudotransduzierten BMDCs. Für die BMDCs, die mit dem *Pfkl*-Vektor transduziert worden waren, also das Gen *Pfkl* überexprimieren, ergaben sich durchschnittlich  $74,5\% \pm 9,3$  ausgereifere BMDCs. Für die hCD2-Kontrolle zeigten sich  $65,9\% \pm 8,7$  ausgereifere Zellen. Von den pseudotransduzierten BMDCs entwickelten sich durchschnittlich  $81,2\% \pm 4,7$  zu ausgereiften Zellen. Für die untransduzierten Kontrollzellen ergaben sich deutlich weniger, nur circa halb so viele ausgereifte Zellen wie für die ersten drei Gruppen:  $31,7\% \pm 6,6$ . Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierten BMDCs und den untransduzierten BMDCs (Abb. 8A und 8B). Ebenso ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Pseudotransduzierten BMDCs und den untransduzierten BMDCs hinsichtlich der Menge ausgereifter Zellen ( $p < 0,01$ ) (Abb. 8B). Zwischen der hCD2-Kontrolle, den pseudotransduzierten BMDCs und den BMDCs transduziert mit dem *Pfkl*-Vektor ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ausreifung (Abb. 8B).

Um die Auswirkungen der Überexpression von *Pfkl* auf die Ausreifung von BMDCs intensiver zu untersuchen, wurde in weiterführenden Analysen an Tag 7 der Zellkultur nach Protokoll 3 mit LPS oder Poly I:C stimuliert (Abb. 8C). 24 Stunden nach LPS bzw. Poly I:C Gabe wurde die Ausreifung anhand der Marker CD86 und MHCII in der DFZ analysiert (zuvor *Gating* auf lebende, differenzierte DCs mit anschließendem *Gating* der erfolgreich transduzierten BMDCs). Dabei wurden die BMDCs, die mit dem *Pfkl*-Vektor transduziert worden waren mit der hCD2-Kontrolle bezüglich der Ausreifung verglichen (Abb. 8D). Für eine Stimulation mit LPS ergaben sich für beide Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei der Ausreifung (Abb. 8E). Die hCD2-Kontrolle zeigte durchschnittlich  $85,0\% \pm 4,8$  ausgereifte BMDCs, während die mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierten BMDCs  $88,7\% \pm 4,0$  ausgereifte BMDCs zeigten. Nach einer Stimulation mit Poly I:C zeigten sich für die hCD2-Kontrolle Werte von  $66,6\% \pm 10,9$  MHCII<sup>high</sup>CD86<sup>high</sup> BMDCs und für die mit dem *Pfkl*-Vektor

transduzierten BMDCs  $69,9\% \pm 2,5$  MHCII<sup>high</sup>CD86<sup>high</sup> BMDCs. Es ergab sich daher kein signifikanter Unterschied (Abb. 8 E).



**Abbildung 8: Auswirkungen der Überexpression von *Pfk1* auf die Ausreifung von DCs:**

(A) Dargestellt sind repräsentative FACS Plots für n=3 unabhängige Experimente. Die Ausreifung der DCs wird anhand der Oberflächenantigene CD86 und MHCII in der DFZ untersucht. Es wird die Ausreifung der BMDCs die *Pfk1* überexprimieren mit einer untransduzierten Kontrolle, pseudotransduzierten BMDCs und der *hCD2*-Kontrolle verglichen. Die Zahlen zeigen die durchschnittlich erreichten Prozentzahlen  $\pm$  SEM der MHCII<sup>high</sup> und CD86<sup>high</sup> BMDCs.

(B) Die Abbildung zeigt die in (A) gezeigten Ergebnisse als Balkendiagramm. Die statistische Analyse wurde mit dem One-Way-Anova-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) durchgeführt.

(C) Zeitachse: Protokoll 3 mit Stimulation der Zellen mit LPS oder Poly I:C an Tag 7 der Zellkultur.

(D) Untersuchung der Ausreifung von DCs die *Pfk1* überexprimieren nach Stimulation mit LPS oder Poly I:C im Vergleich mit der *hCD2*-Kontrolle. Dargestellt sind repräsentative FACS Plots für n=3 unabhängige Experimente. Die Zahlen zeigen die durchschnittlich erreichte Prozentzahl  $\pm$  SEM der MHCII<sup>high</sup> und CD86<sup>high</sup> BMDCs.

(E) Die Balkendiagramme zeigen analog zu (D) den erreichten Prozentsatz ausgereifter Zellen nach Stimulation mit LPS oder Poly I:C für Zellen die *Pfk1* überexprimieren im Vergleich zu der *hCD2*-Kontrolle. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's T-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) durchgeführt.

#### 4.3.3 Auswirkungen der Überexpression von *Pfkl* auf die Zytokinproduktion von CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> BMDCs

Um weitere Aspekte der Ausreifung zu untersuchen, wurde auch die funktionelle Ausreifung der BMDCs anhand der Zytokinproduktion analysiert. Zytokine spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort und der Interaktion mit anderen Immunzellen und die Produktion verändert sich mit dem Reifegrad der DCs [31].

Die Zytokinproduktion unter verschiedenen Bedingungen (unstimuliert oder nach LPS oder Poly I:C Stimulation) zweier Gruppen wurde dabei verglichen: Die erste Gruppe sind BMDCs die *Pfkl* durch lentivirale Transduktion überexprimieren (im Folgenden bezeichnet als *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen), diese werden mit der hCD2-Kontrolle verglichen. Dazu wurde ebenfalls der in Protokoll 3 beschriebene Versuchsablauf genutzt. Für die Gewinnung der Zytokine wurde an Tag 8 von Protokoll 3 vor der Analyse der Zellen in der DFZ der Überstand abgenommen (Abb. 9A). Ebenso wurde der Überstand von den mit LPS und Poly I:C stimulierten Zellen abgenommen und mithilfe eines Cytometric Bead Array untersucht, siehe Methoden 3.2.2.2. Analysiert wurde die Menge der Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Monocytic chemotactic protein 1 (MCP-1), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 12p70 (IL-12p70) (Abb. 9B).

Für das Zytokin IL-12p70 konnte keine statistische Auswertung bezüglich der nicht stimulierten Zellen erfolgen, da es zu Messfehlern kam (für die hCD2-Kontrolle konnte nur für eine Probe ein Wert gemessen werden).

Nach Stimulation der BMDCs mit LPS oder Poly I:C wurde wenig Zytokin von den BMDCs produziert. Es zeigten sich Konzentrationen zwischen 3-30 pg/ml. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der produzierten Menge der zwei Gruppen (zwischen *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle).

In dieser Arbeit konnte weiterhin beobachtet werden, dass geringe Mengen des Zytokins TNF durch unstimulierte BMDCs produziert worden war und ebenfalls geringe Mengen nach Stimulation mit Poly I:C durch beide Gruppen (*Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle). Es ergaben sich Konzentrationen von unter 100 pg/ml, aber oberhalb der Detektionsgrenze. Nach Stimulation der Zellen mit LPS zeigte sich ein starker Anstieg der Zytokinproduktion verglichen mit den nicht stimulierten BMDCs bzw. nach Poly I:C Stimulation. Hierbei produzierten Zellen die *Pfkl* überexprimieren durchschnittlich  $3081,2 \pm 635$  pg/ml TNF und die hCD2

Kontrolle durchschnittlich  $3311,2 \pm 428,4$  pg/ml TNF. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle nach LPS Stimulation, Poly I:C Stimulation oder unstimuliert.

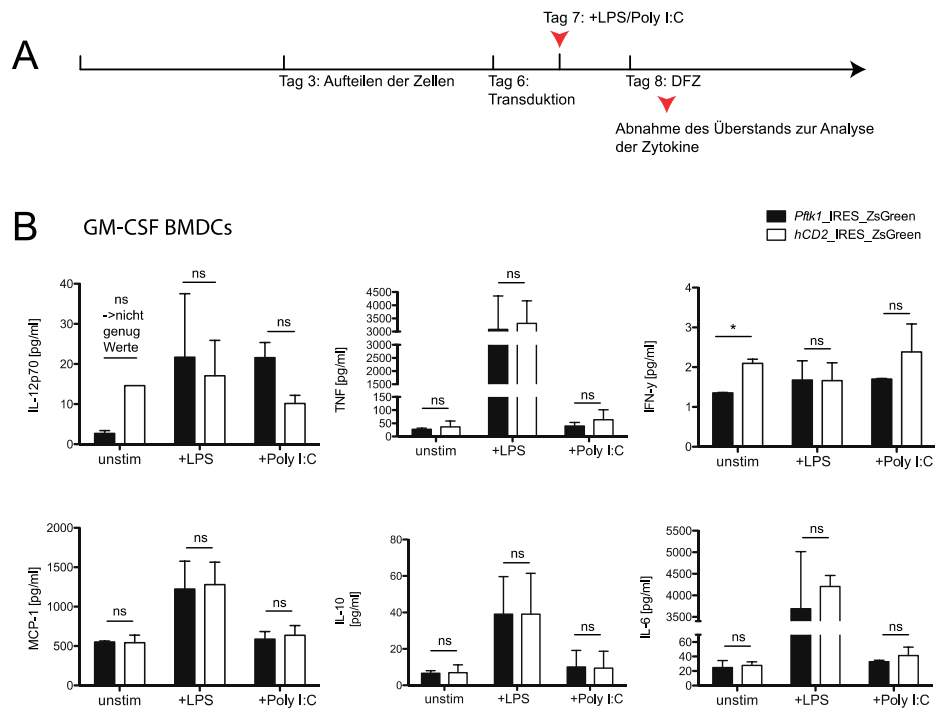
Das Zytokin IFN- $\gamma$  wurde von BMDCs nur in geringen Mengen produziert. Es ergaben sich Konzentrationen im Bereich der Detektionsgrenze. Es wurden für nicht stimulierte und stimulierte Zellen einstellige Konzentrationen des Zytokins für beide Gruppen (*Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und die hCD2 Kontrolle) erreicht. Es ergaben sich durchschnittlich  $1,4 \pm 0,01$  pg/ml IFN- $\gamma$  für unstimulierte Zellen, transduziert mit dem *Pfkl*-Vektor, während sich für die hCD2-Kontrolle Werte von  $2,1 \pm 0,08$  pg/ml IFN- $\gamma$  ergaben. Daraus resultierte ein signifikanter Unterschied zwischen *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Aussagekraft ist bei sehr niedrigen Zytokinleveln im Bereich der Detektionsgrenze allerdings sehr eingeschränkt. Für die mit LPS oder Poly I:C stimulierten Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied für die Menge von IFN- $\gamma$  für die zwei Gruppen.

Für das Zytokin MCP-1 ergaben sich durchschnittlich Konzentrationen für die nicht stimulierten Zellen von  $551,0 \pm 6,7$  pg/ml für *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und  $542,0 \pm 48,2$  pg/ml für die hCD2-Kontrolle. Für MCP1, welches von mit LPS stimulierten Zellen produziert worden war, ergaben sich deutlich höhere Werte von  $1224,3 \pm 176,6$  pg/ml für *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und  $1279,7 \pm 141,5$  pg/ml für die hCD2-Kontrolle. Für die mit Poly I:C stimulierten Proben ergaben sich Konzentrationen im Bereich zwischen 550-650 pg/ml für *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und die hCD2-Kontrolle. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (weder unstimuliert noch nach LPS oder Poly I:C Stimulation).

Für das Zytokin IL-10 konnte ebenfalls der Effekt beobachtet werden, dass nach Stimulation mit LPS deutlich mehr Zytokin von beiden Gruppen produziert worden war im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen bzw. Zellen die mit Poly I:C stimuliert worden waren. Für die unstimulierten Zellen ergaben sich für beide Gruppen niedrige Konzentrationen um die 6 pg/ml und für Poly I:C für beide Gruppen um die 9-10 pg/ml. Für die Zellen die mit LPS stimuliert worden waren ergaben sich um die 39 pg/ml für beide Gruppen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Pfkl*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle.

Der Effekt, der nach Stimulation mit LPS für andere Zytokine beobachtet werden konnte, wurde bei Analyse des Zytokins IL-6 noch deutlicher. Während sich die Konzentrationen für das Zytokin von nicht stimulierten und Poly I:C stimulierten Zellen der beiden Gruppen zwischen 15 bis 35 pg/ml bewegte, ergaben sich nach Stimulation

mit LPS über 3000 pg/ml des Zytokins für beide Gruppen. Zwischen den zwei Gruppen (*Pf1k1*\_IRES\_ZsGreen und der hCD2-Kontrolle) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 9: Zytokinproduktion durch BMDCs die *Pf1k1* durch lentivirale Transduktion überexprimieren im Vergleich zu der hCD2-Kontrolle und Vergleich der produzierten Menge dieser zwei Gruppen nach Stimulation mit LPS oder Poly I:C:**

(A) Abnahme des Überstands an Tag 8 der Zellkultur und Analyse der enthaltenen Zytokine (IL12p70, TNF, IFN-γ, MCP-1, IL-10 und IL-6) mittels Cytometric Bead Array und DFZ.

(B) Die Balkendiagramme zeigen die erreichte Menge (in pg/ml) ± SEM der verschiedenen Zytokine. Es wird die produzierte Menge an Zytokinen von Zellen die *Pf1k1* überexprimieren mit der produzierten Menge an Zytokinen der hCD2-Kontrolle verglichen.

Die Gruppen enthalten jeweils n=2-4 Proben aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Statistik wurde mit dem Student's T-Test durchgeführt (\* p<0,05, \*\* p<0,01).

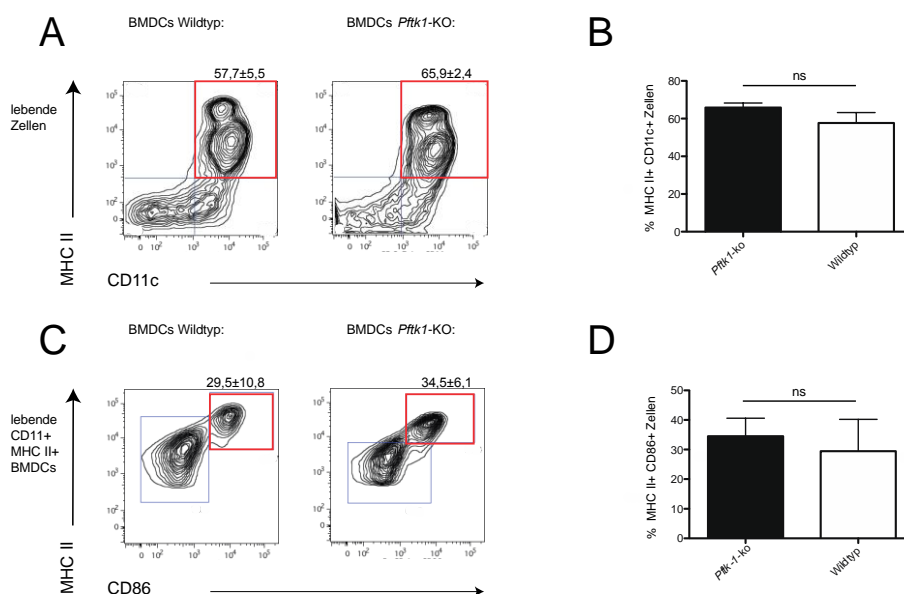
#### 4.4 Analyse der Auswirkungen eines Gen-Knockout von *Pf1k1* auf die Differenzierung und Ausreifung von BMDCs

Um einen Einfluss des Gens *Pf1k1* auf die Differenzierung und Ausreifung von BMDCs weiter zu untersuchen, wurden hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark einer *Pf1k1*-KO-Maus in Kultur genommen. Die Zellen wurden an Tag 3 der Zellkultur aufgeteilt und an Tag 8 in der DFZ analysiert (analog zum zeitlichen Ablauf des Protokoll 3). Als Kontrolle dienten Zellen aus einer C57BL/6 Maus.

Es wurden lebende Zellen ausgewählt und anschließend anhand der Oberflächenantigene CD11c und MHCII die BMDCs in der DFZ bestimmt. Aus

hämatopoetischen Vorläuferzellen der C57BL/6 Maus differenzierten sich durchschnittlich  $57,7 \pm 5,5\%$  zu  $CD11^+MHCII^+$  BMDCs. Aus den Vorläuferzellen der *Pfkl*-KO-Maus entwickelten sich durchschnittlich  $65,9 \pm 2,4\%$  zu  $CD11^+MHCII^+$  BMDCs. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 10A und 10B).

Zusätzlich wurde die Ausreifung der  $CD11c^+MHCII^+$  BMDCs anhand der Marker CD86 und MHCII (Abb. 10C und 10D) untersucht. Für BMDCs der C57BL/6 Maus ergaben sich durchschnittlich  $29,5 \pm 10,8\%$   $MHCII^{high}CD86^{high}$  BMDCs und für die BMDCs der *Pfkl*-KO-Maus durchschnittlich  $34,5 \pm 6,1\%$  ausgereifere BMDCs. Kein signifikanter Unterschied konnte beobachtet werden (Abb. 10D).



**Abbildung 10: Auswirkungen eines Gen-KO von *Pfkl* auf die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs und Auswirkungen auf die Ausreifung der BMDCs im Vergleich zu Zellen aus einer C57BL/6 Maus:**

(A) Die hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden 8 Tage in Kultur gehalten und anschließend in der DFZ untersucht. Dargestellt sind repräsentative FACS Plots für  $n=2$  unabhängige Experimente, gated ist auf lebende Zellen. Der Prozentsatz der DCs wurde anhand der Oberflächenantigene CD11c und MHCII bestimmt. Die Zahlen stellen den durchschnittlich erreichten Prozentsatz  $\pm$  SEM der MHCII und CD11c positiven Zellen dar.

(B) Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlich erreichten Prozentzahlen  $\pm$  SEM MHCII und CD11c positiver Zellen der zwei Gruppen mit jeweils  $n=2$ . Die statistische Analyse wurde mit dem Student's T-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) durchgeführt.

(C) Analyse der Ausreifung: Dargestellt sind repräsentative FACS Plots für  $n=2$  unabhängige Experimente, es erfolgte eine Selektion auf lebende CD11c und MHCII positive Zellen in der DFZ. Die Ausreifung wurde anhand der Oberflächenantigene CD86 und MHCII untersucht. Die Zahlen zeigen die durchschnittlich erreichte Prozentzahl  $\pm$  SEM der  $MHCII^{high}$  und  $CD86^{high}$  BMDCs.

(D) Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittlich erreichte Prozentzahl  $\pm$  SEM erreichter  $MHCII^{high}$  und  $CD86^{high}$  BMDCs der zwei Gruppen mit jeweils  $n=2$ . Die statistische Analyse wurde mit dem Student's T-Test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) durchgeführt.

## 5 Diskussion

Die Funktion des Gens *Pfkl* in DCs ist bisher weitestgehend unbekannt [3]. In dieser Arbeit ging es darum mithilfe eines Überexpressionsmodells und eines Knockout-Modells Einflüsse des Gens auf die Differenzierung und Ausreifung von BMDCs zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied bei der phänotypischen Ausreifung oder Zytokinproduktion nach Überexpression von *Pfkl* durch lentivirale Transduktion nachgewiesen werden. Eine weiterführende Analyse des Gens anhand von *Pfkl*-KO-Zellen zeigte ebenfalls keinen Unterschied bei der Differenzierung oder Ausreifung im Vergleich zu BMDC-Wildtypzellen. Diese Ergebnisse machen einen Einfluss des Gens auf die Ausreifung oder Differenzierung der BMDCs unwahrscheinlicher. Allerdings konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied bei der Ausreifung zwischen den lentiviral transduzierten Zellen und den nicht transduzierten Zellen gesehen werden. Dies deutet daraufhin, dass die Transduktion allein bereits ein starker Stimulus für die phänotypische Ausreifung der BMDCs ist, sodass Effekte der Überexpression möglicherweise gar nicht dargestellt werden können bzw. überlagert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Methode der lentiviralen Transduktion für die Analyse von DCs möglicherweise nur eingeschränkt genutzt werden kann.

### 5.1 Überexpression durch lentivirale Transduktion

#### 5.1.1 Analyse verschiedener Transduktionsprotokolle

In einem ersten Schritt ging es in dieser Arbeit um die Etablierung eines funktionierenden und effektiven Transduktionsprotokolls. Drei Transduktionsprotokolle wurden hierfür getestet. Analysiert wurde welches der drei Protokolle eine effektive Überexpression des Gens *Pfkl* ermöglicht und damit für spätere Funktionsanalysen geeignet ist. Dabei unterscheiden die Protokolle sich vor allem bezüglich des Transduktionszeitpunkts, sowie dem zeitlichen Abstand zwischen Transduktion und Analyse (Abb. 6A).

Protokoll 1 und 2 erwiesen sich als ungeeignet. Mit beiden Protokollen konnten in dieser Arbeit nur sehr geringe Prozentsätze transduzierter BMDCs erreicht werden.

Mögliche Gründe könnten der große zeitliche Abstand zwischen Transduktion und Analyse sein. Es könnte bedeuten, dass die Zellen nach einer frühen lentiviralen Transduktion im Verlauf nach einigen Tagen sterben. Hinweise dafür liefern auch



Daten dieser Arbeit. Der Prozentsatz erreichter BMDCs ist für Protokoll 1 und 2 deutlich niedriger als für Protokoll 3 (Abb. 6 D). Eine andere Studie konnten zeigen, dass DCs besonders nach Stimulation zur Ausreifung schneller apoptotisch werden [78]. In den folgenden Abschnitten wird ausführlich auf die immunogene Wirkung der lentiviralen Transduktion eingegangen. Sollte diese These zutreffen könnte dies die niedrige Transduktionseffizienz der Protokolle 1 und 2 erklären. In anderen Arbeiten hatte sich jedoch keine Auswirkung einer lentiviralen Transduktion auf das Überleben der Zellen gezeigt [79, 80]. Eine weitere mögliche Ursache könnte im frühen Transduktionszeitpunkt begründet liegen (an Tag 2 der Zellkultur für Protokoll 1 und an Tag 1 für das 2. Protokoll). Protokoll 3 erwies sich als funktionierendes Protokoll. Es konnten durchschnittlich 36% erfolgreich mit dem *Pfkl*-Vektor transduzierte Zellen in der DFZ nachgewiesen werden. Dabei werden die Zellen an Tag 6 transduziert. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich zwischen Tag 4 und 6 die meisten DCs *in vitro* entwickeln [45]. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein später Transduktionszeitpunkt zu einer höheren Transduktionseffizienz führt. Entscheidend könnte aber nicht nur der Transduktionszeitpunkt sein, sondern eine Transduktion nach oder während des Proliferationshöhepunkts der Zellen [81]. In einer Arbeit von Li *et al.* 2009 [81] zeigte sich die höchste Transduktionseffizienz an Tag 4 der Zellkultur (circa 42% erfolgreich transduzierte BMDCs). Die durchflusszytometrische Analyse wurde in der genannten Arbeit ebenfalls an Tag 8 (bzw. Tag 10) durchgeführt. Als möglicher Grund wird der Proliferationszeitpunkt aufgeführt. Eine Erneuerung des Mediums mit Wachstumsfaktoren wurde an Tag 3 durchgeführt. Dies führt möglicherweise zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen. Proliferierende Zellen sind in der Lage exogene DNA besser aufzunehmen [81].

Die in der Arbeit von Li *et al.* 2009 [81] aufgeführten Hintergründe einer besseren Transduktionseffizienz könnten auch für diese Arbeit zutreffen. Protokoll 1 und 2 zeichnen sich durch einen frühen Transduktionszeitpunkt ohne eine vorherige Erneuerung des Mediums oder der Wachstumsfaktoren aus. Protokoll 3 hingegen beinhaltet das Aufteilen und Erneuern des Mediums an Tag 3. Dies induziert möglicherweise einen Proliferationshöhepunkt vor der Transduktion an Tag 6.

Um die genauen Mechanismen der unterschiedlichen Transduktionseffizienz der Protokolle zu klären, sind weitere Analysen notwendig. Beispielsweise könnten frühere Analysen für Protokoll 1 und 2 an verschiedenen Tagen der Zellkultur klären ob Zellen im Verlauf sterben.

### 5.1.2 Kultur von DCs *in vitro*

DCs wurden in dieser Arbeit aus hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C57/BL6 Mäusen gewonnen. Hierfür wurde die etablierte Methode der GM-CSF Kultur genutzt. Diese Methode ermöglicht es eine größere Anzahl DCs *in vitro* zu generieren. *In vivo* kommt dieser Zelltyp normalerweise nur in geringen Mengen vor [45]. Auch wird *Pfkl* konstant exprimiert in GM-CSF BMDCs [3]. Allerdings hat sich in Studien gezeigt, dass durch diese Methode keine reine Kultur DCs erreicht werden kann und Makrophagen ebenfalls die Marker CD11c und MHCII exprimieren [44]. Dadurch wird die Unterscheidung dieser zwei Zellpopulationen erschwert und Untersuchungen möglicherweise verfälscht. Besonders da diese Marker üblicherweise zur Selektion der DCs genutzt werden. Für diese Arbeit wäre deswegen möglicherweise eine Flt3 Kultur geeigneter gewesen. Durch eine Flt3 Kultur können DCs generiert werden, die den CD8<sup>+</sup> DCs *in vivo* ähnlicher sind und sich in Bezug auf die Zytokinproduktion auch ähnlicher verhalten [82, 83].

### 5.1.3 Auswirkungen der Überexpression von *Pfkl* auf die Ausreifung und Zytokinproduktion von BMDCs

Nachdem sich Protokoll 3 als ausreichend effektiv erwiesen hatte, wurde es für die Analyse der Ausreifung nach Überexpression genutzt.

Es zeigte sich in den Analysen kein signifikanter Unterschied bei der Ausreifung zwischen den BMDCs die *Pfkl* überexprimieren, den pseudotransduzierten BMDCs und der hCD2-Kontrolle. Auch nach Stimulation der BMDCs mit LPS bzw. Poly I:C zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Gens *Pfkl* auf die Zytokinproduktion von DCs untersucht. Der Grad der Ausreifung der BMDCs hat Auswirkungen auf die Menge und Art der produzierten Zytokine [31]. Nach Überexpression des Gens *Pfkl* wurden die BMDCs an Tag 7 der Zellkultur mit LPS oder Poly I:C zur Ausreifung angeregt. An Tag 8 der Zellkultur wurde der Überstand auf Zytokine untersucht. Dabei wurden sechs verschiedene Zytokine analysiert: MCP-1, IL-12p70, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF. Untersucht wurde die Menge sekretierter Zytokine. Verglichen wurden diese mit der Menge an produzierten Zytokinen von BMDCs, die mit dem Kontrollvektor hCD2 transduziert worden waren. Die genannten Zytokine der beiden Gruppen (BMDCs mit *Pfkl* Überexpression und hCD2-Kontrolle) wurden zusätzlich ebenfalls ohne Stimulation untersucht. Es konnte, außer für das Zytokin IFN- $\gamma$ , kein signifikanter

Unterschied zwischen den BMDCs mit *Pfkl1* Überexpression und der hCD2-Kontrolle detektiert werden. Weder nach LPS oder Poly I:C Stimulation, noch unstimuliert.

Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Einfluss des Gens auf die Ausreifung und Zytokinproduktion von DCs. Experimente mit *Pfkl1*-KO BMDCs unterstützen diese Schlussfolgerung, siehe 5.2.

Einzig für das Zytokin IFN- $\gamma$  wurde ein signifikanter Unterschied gesehen. BMDCs mit Überexpression von *Pfkl1* produzierten unstimuliert eine signifikant geringere Menge IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den Kontrollzellen mit hCD2. Das Zytokin IFN-  $\gamma$  wurde von den stimulierten und unstimulierten BMDCs allerdings nur in sehr geringen Mengen im Bereich der Detektionsgrenze produziert. Bei insgesamt kaum vorhandener Zytokinsekretion von IFN- $\gamma$  ist die Aussagekraft somit eingeschränkt.

Eine Vielzahl weiterer Gründe kann jedoch ausschlaggebend für die Resultate der Überexpressionsexperimente gewesen sein, so dass weiterführende Analysen notwendig werden um einen Einfluss des Gens sicher auszuschließen. Daten des "immunologic genome project" zeigen, dass *Pfkl1* vor allem in CD8<sup>+</sup> DCs exprimiert wird [75]. Möglicherweise wäre daher die oben genannte Flt3 Kultur für die Funktionsanalyse des Gens in DCs ebenfalls eine interessante Möglichkeit. Weiterhin könnte die Methode der lentiviralen Überexpression die Ausreifung und Zytokinproduktion beeinflussen, hierauf wird in Abschnitt 5.1.4 eingegangen.

#### **5.1.4 Immunogene Einflüsse lentiviraler Transduktion auf BMDCs**

In den Analysen konnte kein signifikanter Unterschied bei der Ausreifung zwischen den BMDCs die *Pfkl1* überexprimieren, den pseudotransduzierten BMDCs und der hCD2-Kontrolle nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich allerdings zwischen den BMDCs nach lentiviraler Transduktion und den nicht transduzierten BMDCs.

Sowohl BMDCs transduziert mit dem *Pfkl1*-Vektor, als auch BMDCs transduziert mit dem hCD2-Vektor und die pseudotransduzierten BMDCs waren bereits zu einem relativ großen Anteil ausgereift mit durchschnittlich über 60% CD86<sup>high</sup> MHCII<sup>high</sup> BMDCs. Nicht transduzierte BMDCs zeigten sich in der DFZ zu einem deutlich geringeren Prozentsatz ausgereift. Es konnten durchschnittlich 31% ausgereifte CD86<sup>high</sup> MHCII<sup>high</sup> BMDCs nachgewiesen werden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht transduzierten BMDCs und den BMDCs mit *Pfkl1*-Überexpression und den Pseudotransduzierten BMDCs (Abb. 8B).

Diese signifikanten Ergebnisse weisen auf einen immunogenen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf BMDCs hin. Auch für andere virale Gentransfervehikel konnte bereits ein solcher Effekt für DCs gezeigt werden, unter anderem für rekombinanten Adenovirus. Der Gentransfer mittels Adenoviren ermöglicht eine effektive Transduktion von DCs. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die DCs CD86 und MHCII hochregulieren [84]. In Arbeiten von Breckpot *et al.* 2007 und 2010 [4, 79] konnte gezeigt werden, dass auch die lentivirale Transduktion eine Aktivierung von DCs bewirkt. Es kommt zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie MHCII, CD86 und CD11c. Es wird gezeigt, dass dieser Effekt TLR 3 und 7 abhängig ist und die virale reverse Transkriptase ebenfalls eine wesentliche Rolle spielt [4, 79].

Dieser Effekt erschwert die Analyse eines möglichen Einflusses von *Pfkl* auf die Ausreifung mittels lentiviraler Überexpression. Möglicherweise wären die Protokolle 1 und 2 in dieser Hinsicht günstiger gewesen, da die immunogene Wirkung der Lentiviren auf die Vorläuferzellen einen weniger starken Effekt ausgeübt hätte. Dies zeigt sich in Arbeiten von He *et al.* 2005 [85] in denen ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt eine lentivirale Transduktion durchgeführt wird, hier zeigen die DCs keine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle [85].

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Ausreifung nach Stimulation mit LPS und Poly I:C untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die BMDCs nach lentiviraler Transduktion durch LPS noch stimuliert werden können [86]. Dies zeigt sich auch in dieser Arbeit. Es zeigen sich durchschnittlich über 80% ausgereifte Zellen. Im Vergleich zu durchschnittlich über 60% ausgereiften BMDCs ohne Stimulation. Es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen die *Pfkl* überexprimieren und der hCD2-Kontrolle. Die immunogenen Auswirkungen der lentiviralen Transduktion könnten hier aber erneut eine Analyse erschweren.

Die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs und das Überleben der BMDCs scheint von der lentiviralen Transduktion mit Protokoll 3 nicht beeinflusst zu sein (Abb. 6). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen transduzierten und untransduzierten Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Arbeiten nach einem Gentransfer mittels Adenoviren gezeigt werden [84].

Die immunogenen Effekte der lentiviralen Transduktion auf die phänotypische Ausreifung müssen auch für die funktionelle Ausreifung berücksichtigt werden. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass vermehrt Zytokine nach lentiviraler Transduktion sezerniert werden, beispielsweise IL-6 und TNF alpha. Bei Transduktion

mit hohen Dosen wurde ebenfalls vermehrt IL-12p70 und IL-10 sezerniert [79]. Dies könnte mögliche Effekte der Überexpression von *Pfkl* auf die Zytokinproduktion überlagern und erschwert eine Aussage über den Einfluss des Gens.

In Studien wurde gezeigt, dass IL-6 erst nach Ausreifung von DCs sezerniert wird. In dieser Arbeit wurde auch von den unstimulierten BMDCs bereits dieses Zytokin produziert. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Lentiviren bereits zu einer Ausreifung der BMDCs und damit Zytokinproduktion führen. GM-CSF ist jedoch auch ein Stimulus für die Ausreifung von DCs und könnte hier ebenfalls eine Rolle gespielt haben [31].

Für die Zytokine IL-10, TNF und IL-12p70 wurde dieser Effekt in dieser Arbeit nicht beobachtet. Für TNF ist beschrieben, dass es bereits von nicht ausgereiften DCs sekretiert wird [31]. Dies stimmt mit Beobachtungen in dieser Arbeit überein.

Für die Zytokine TNF, MCP-1, IL-10 und IL-6 wurde eine weitere interessante Beobachtung gemacht. Es zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den BMDCs mit *Pfkl* Überexpression und der hCD2-Kontrolle, jedoch zeigt sich für die Zellen nach LPS Stimulation ein erwarteter physiologischer Unterschied zu den unstimulierten Zellen (für die BMDCs mit *Pfkl* Überexpression wie auch die hCD2 Kontrolle). Nach Stimulation mit LPS wurde deutlich mehr TNF, MCP-1, IL-10 und IL-6 sezerniert. Dieses Ergebnis passt zu Daten aus einer Studie, die besagt, dass auf verschiedene Stimuli unterschiedliche Zytokine und die Zytokine unterschiedlich stark sezerniert werden. In dieser Studie konnten nach LPS Stimulation erhöhte TNF und IL-6 mRNA Level bzw. Zytokine im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden [31, 32]. Dieser Effekt ist nach Stimulation mit Poly I:C in dieser Arbeit nicht zu sehen. Dieses Ergebnis liefert Hinweise dafür, dass trotz möglicher immunogener Effekte der lentiviralen Transduktion und damit Stimulation zur Ausreifung und Zytokinproduktion entweder noch nicht die volle Ausreifung erreicht ist oder aber, dass die Stimulation durch die Lentiviren nicht dieselbe Auswirkung wie eine Stimulation mit LPS hat.

Für das Zytokin IFN- $\gamma$  konnte kein solcher Effekt nach LPS Stimulation gezeigt werden was mit der bereits genannten Studie in murinen DCs überein stimmt [31].

Immunogene Effekte der lentiviralen Transduktion könnten bei der Sekretion von IL-6 durch unstimulierte DCs eine Rolle gespielt haben. Für die anderen Zytokine konnte kein wesentlicher immunogener Effekt der lentiviralen Transduktion nachgewiesen werden. Möglicherweise hat die lentivirale Transduktion auf die funktionelle Ausreifung eine deutlich geringere Auswirkung als auf die phänotypische Ausreifung. Hier wäre es

interessant weitere Aspekte der Ausreifung wie beispielsweise die Migration zu untersuchen.

Eine Alternative zum hier verwendeten Ansatz wäre es die Zytokinproduktion der *Pfkl*-KO- Zellen zu untersuchen um eine mögliche Stimulation durch die lentivirale Transduktion zu vermeiden und mögliche Effekte von *Pfkl* zu erkennen.

## 5.2 Funktionsanalyse des Gens *Pfkl* – *Pfkl*-KO Modell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lentivirale Transduktion immunogene Auswirkungen auf BMDCs haben kann. Eine Analyse der Auswirkungen von *Pfkl* auf die Ausreifung wurde dadurch erschwert.

Eine Analyse ohne lentivirale Transduktion erschien deshalb sehr interessant. Zellen aus einer *Pfkl*-KO-Maus wurden *in vitro* kultiviert und im Anschluss in der DFZ analysiert. Hierzu wurden ebenfalls die Marker CD86 und MHCII herangezogen. Im Vergleich mit C57BL/6-Wildtypzellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Ausreifung. Auch die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu BMDCs scheint nicht durch den *Pfkl*-KO beeinflusst. Es ergibt sich kein Hinweis auf einen Einfluss des Gens auf die phänotypische Ausreifung der BMDCs. Hiermit ist jedoch nur ein kleiner Teilaspekt der Ausreifung untersucht und tiefergehende Analysen der *Pfkl*-KO Maus sind notwendig um einen Effekt des *Pfkl*-KO auf die Ausreifung auszuschließen. Die Untersuchung der funktionellen Ausreifung der *Pfkl*-KO Zellen wäre eine interessante Möglichkeit weitere Erkenntnisse zu sammeln.

## 5.3 Fazit und Ausblick

Genexpressionsdaten von *Pfkl* in DCs aus der Arbeit von Edelmann *et al.* 2011 [3] ließen eine mögliche Funktion von *Pfkl* bei der Ausreifung vermuten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Überexpression des Gens konnte eine derartige Funktion in DCs nicht bestätigen, wobei der Effekt der Überexpression sowohl auf die phänotypische als auch funktionelle Ausreifung geprüft wurde. Auch komplementäre Untersuchungen von *Pfkl*-KO BMDCs lieferten keinen Hinweis auf eine kritische Funktion des Gens in DCs, denn die phänotypische Ausreifung war durch den KO nicht beeinflusst. Zusammenfassend bleibt die Funktion des Gens in DCs weiterhin überwiegend unklar.

Die phänotypische Ausreifung der BMDCs zeigte sich jedoch unabhängig vom transduzierten Genprodukt stark durch die lentivirale Transduktion beeinflusst. Die lentivirale Transduktion mit dem hier verwendeten Protokoll führte zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle. Immunogene Effekte der lentiviralen Transduktion sind bereits in anderen Arbeiten vorbeschrieben [4, 79]. Eine Analyse der phänotypischen Ausreifung der BMDCs scheint mittels lentiviraler Überexpression deswegen nur eingeschränkt möglich. Eine Modifikation der benutzten Protokolle könnte die immunogenen Effekte möglicherweise minimieren, z.B. wäre eine frühe Transduktion und DFZ-Analyse ein möglicher Ansatz [85].

Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den beschriebenen phänotypischen Veränderungen kein ausgeprägter immunogener Effekt auf die funktionelle Ausreifung (Zytokin-Produktion) der Zellen beobachtet werden. So wiesen in dieser Studie transduzierte BMDCs ohne LPS Stimulation eine physiologisch zu erwartende niedrige Zytokinproduktion auf. Dies deutet daraufhin, dass die BMDCs durch die lentivirale Transduktion nicht *per se* zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen angeregt werden. Dies spricht für einen differentiellen Effekt der lentiviralen Transduktion auf verschiedene Aspekte der Reifung von DCs. Um einen Einfluss der Lentiviren auf die Zytokinproduktion aber vollständig auszuschließen, wäre eine nicht lentiviral transduzierte Kontrolle als Negativkontrolle hilfreich.

Da die funktionelle Ausreifung nicht so stark von der lentiviralen Transduktion beeinflusst zu sein scheint, würden sich weitere funktionelle Ausreifungsanalysen der BMDCs für die Analyse des Gens *Pfkl* anbieten. Hierbei würden beispielsweise Untersuchungen zur Migration, Phagozytose und Antigenpräsentation in Frage kommen.

Zusätzlich wäre eine Analyse der *Pfkl*-defizienten DCs *in vitro* und *in vivo* mithilfe der *Pfkl*-Ko-Maus ein Ansatz, um zusätzlich über die Ausreifung hinaus Hinweise auf eine mögliche Funktion von *Pfkl* in DCs zu erlangen. Mögliche Vorgehensweisen wurden in einer Arbeit von Zwick *et al.* 2019 [87] für ein anderes Gen in DCs beschrieben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Tan, J.K. and H.C. O'Neill, *Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 319-24.
2. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 296-306.
3. Edelmann, S.L., P.J. Nelson, and T. Brocker, *Comparative promoter analysis in vivo: identification of a dendritic cell-specific promoter module*. Blood, 2011. **118**(11): p. e40-9.
4. Breckpot, K., et al., *HIV-1 lentiviral vector immunogenicity is mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5627-36.
5. Medzhitov, R., D.S. Schneider, and M.P. Soares, *Disease tolerance as a defense strategy*. Science, 2012. **335**(6071): p. 936-41.
6. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
7. Dempsey, P.W., S.A. Vaidya, and G. Cheng, *The art of war: Innate and adaptive immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2604-21.
8. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
9. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
10. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 563-604.
11. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
12. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
13. Ohnmacht, C., et al., *Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 549-59.
14. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.-J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nature Immunology, 2004. **5**: p. 1219.
15. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
16. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. Embo j, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
17. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
18. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-7.
19. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
20. Ginhoux, F., et al., *The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3115-30.
21. Crozat, K., et al., *The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1283-92.



22. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 935-947.
23. Wu, L. and K. Shortman, *Heterogeneity of thymic dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. **17**(4): p. 304-12.
24. Belz, G.T. and S.L. Nutt, *Transcriptional programming of the dendritic cell network*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 101-13.
25. Wilson, N.S., et al., *Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2187-94.
26. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
27. Abdi, K., N.J. Singh, and P. Matzinger, *Lipopolysaccharide-activated dendritic cells: "exhausted" or alert and waiting?* J Immunol, 2012. **188**(12): p. 5981-9.
28. Jin, P., et al., *Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 4.
29. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
30. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, *Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 163-70.
31. Morelli, A.E., et al., *Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1512-23.
32. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
33. Villadangos, J.A. and P. Schnorrer, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 543-55.
34. Guernonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
35. Wieczorek, M., et al., *Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 292.
36. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.
37. Wilson, N.S. and J.A. Villadangos, *Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 241-305.
38. Albert, M.L., M. Jegathesan, and R.B. Darnell, *Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1010-7.
39. Steinman, R.M., et al., *Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 15-25.
40. Proietto, A.I., et al., *Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19869-74.
41. Brouck, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen, *Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 541-50.
42. Lehner, T., *Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation*. Immunology, 2008. **123**(1): p. 40-4.

43. Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso, *Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 829-40.
44. Helft, J., et al., *GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1197-1211.
45. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
46. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nature Reviews Immunology, 2006. **7**: p. 19.
47. Shu, F., et al., *Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9248-53.
48. Malumbres, M., et al., *Cyclin-dependent kinases: a family portrait*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1275-6.
49. Hochegger, H., S. Takeda, and T. Hunt, *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**: p. 910.
50. Jiang, M., et al., *Cyclin Y, a novel membrane-associated cyclin, interacts with PFTK1*. FEBS Lett, 2009. **583**(13): p. 2171-8.
51. Besset, V., K. Rhee, and D.J. Wolgemuth, *The identification and characterization of expression of Pftaire-1, a novel Cdk family member, suggest its function in the mouse testis and nervous system*. Mol Reprod Dev, 1998. **50**(1): p. 18-29.
52. Lazzaro, M.A. and J.P. Julien, *Chromosomal mapping of the PFTAIRE gene, Pftk1, a cdc2-related kinase expressed predominantly in the mouse nervous system*. Genomics, 1997. **42**(3): p. 536-7.
53. Yang, L., et al., *PFTK1 Promotes Gastric Cancer Progression by Regulating Proliferation, Migration and Invasion*. PLoS ONE, 2015. **10**(10): p. e0140451.
54. Fan, S., et al., *Knockdown of PFTK1 Inhibits the Migration of Glioma Cells*. J Mol Neurosci, 2015. **57**(2): p. 257-64.
55. Sun, T., N.N. Co, and N. Wong, *PFTK1 interacts with cyclin Y to activate non-canonical Wnt signaling in hepatocellular carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **449**(1): p. 163-8.
56. Prelich, G., *Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation*. Genetics, 2012. **190**(3): p. 841-54.
57. Lewis, P.F. and M. Emerman, *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 510-6.
58. Pluta, K. and M.M. Kacprzak, *Use of HIV as a gene transfer vector*. Acta Biochim Pol, 2009. **56**(4): p. 531-95.
59. Ramezani, A. and R.G. Hawley, *Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System*. Curr Protoc Mol Biol, 2002. **Chapter 16**: p. Unit 16.21.
60. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 1-25.
61. Weinberg, J.B., et al., *Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1477-82.
62. Chinnasamy, D., et al., *Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1309-1316.

63. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
64. Miller, R.H. and N. Sarver, *HIV accessory proteins as therapeutic targets*. Nat Med, 1997. **3**(4): p. 389-94.
65. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
66. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
67. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Production and purification of lentiviral vectors*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 241-5.
68. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8150-7.
69. Thompson, S.R., *Tricks an IRES uses to enslave ribosomes*. Trends Microbiol, 2012. **20**(11): p. 558-66.
70. Testa, G., et al., *A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles*. Genesis, 2004. **38**(3): p. 151-8.
71. *The mouse strain used for this research project, C57BL/6N-Cdk14tm1a(KOMP)Wtsi/Mmucd, RRID:MMRRC\_047032-UCD, was obtained from the Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC) at University of California at Davis, an NIH-funded strain repository, and was donated to the MMRRC by The KOMP Repository, UC Davis Mouse Biology Program. Ramiro Ramirez-Solis, Ph.D., Wellcome Trust Sanger Institute. [cited 2019 24th June 12:00]; Available from: <https://www.komp.org/ProductSheet.php?cloneID=33125>.*
72. Baltimore, D. *pHAGE-CMV-hIL7-IRES-ZsGreen-W, Addgene Plasmid # 26532, von David Baltimore; RRID:Addgene\_26532*. [cited 2019 24th June 13:00]; Available from: <http://n2t.net/addgene:26532>.
73. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
74. Gama-Norton, L., et al., *Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells*. Hum Gene Ther, 2011. **22**(10): p. 1269-79.
75. Heng, T.S.P., et al., *The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells*. Nature Immunology, 2008. **9**: p. 1091.
76. Nakamura, Y., J. Ishii, and A. Kondo, *Bright fluorescence monitoring system utilizing Zoanthus sp. green fluorescent protein (ZsGreen) for human G-protein-coupled receptor signaling in microbial yeast cells*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82237.
77. Perfetto, S.P., et al., *Amine-reactive dyes for dead cell discrimination in fixed samples*. Curr Protoc Cytom, 2010. **Chapter 9**: p. Unit 9.34.
78. Schwiebs, A., et al., *Activation-Induced Cell Death of Dendritic Cells Is Dependent on Sphingosine Kinase 1*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 94.
79. Breckpot, K., et al., *Activation of immature monocyte-derived dendritic cells after transduction with high doses of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(6): p. 536-46.
80. Esslinger, C., P. Romero, and H.R. MacDonald, *Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T-cell response by third-generation lentivectors*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(9): p. 1091-100.
81. Li, G.B. and G.X. Lu, *Gene delivery efficiency in bone marrow-derived dendritic cells: comparison of four methods and optimization for lentivirus transduction*. Mol Biotechnol, 2009. **43**(3): p. 250-6.

82. Naik, S.H., et al., *Cutting edge: generation of splenic CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6592-7.
83. Guillelliams, M. and B. Malissen, *A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells?* Immunity, 2015. **42**(6): p. 988-990.
84. Morelli, A.E., et al., *Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappaB-dependent pathway*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9617-28.
85. He, Y., et al., *Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3808-17.
86. Chinnnasamy, N., et al., *Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(13): p. 1901-9.
87. Zwick, M., et al., *Expression of the Phosphatase Ppaf2 Controls Survival and Function of CD8(+) Dendritic Cells*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 222.

## **7 Danksagung**

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Brocker für die Überlassung des Themas und die vielfache Unterstützung.

Herzlichen Dank an Dr. Markus Zwick für die Einarbeitung, Zusammenarbeit, stete Unterstützung und Hilfe bei allen Fragen.

Besonderen Dank auch an alle Laborkollegen des Instituts für Immunologie für die Unterstützung und nette Atmosphäre und insbesondere an Aga und Jan für die lustigen Laborstunden und Freundschaft.

Leo und Danilo danke ich sehr für das kritische Korrekturlesen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation.